



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNologiÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**OPTIMALIZACE KULTIVACE KAROTENOGENNÍCH
KVASINEK NA SMĚSNÝCH ODPADNÍCH SUBSTRÁTECH**

OPTIMIZATION OF CULTIVATION OF CAROTENOGENIC YEASTS ON MIXED WASTE SUBSTRATES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jiří Holub

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1429/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Bc. Jiří Holub**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Optimalizace kultivace karotenogenních kvasinek na směsných odpadních substrátech

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) příprava směsných substrátů a kultivace vybraných kmenů kvasinek
- 2) průběžné sledování změn produkce metabolitů na odpadních substrátech – syrovátka, lipidy, lignocelulóza
- 3) řízená kultivace na vybraných médiích v laboratorním fermentoru
- 4) sledování změn metabolitů v průběhu růstu pomocí moderních fluorescenčních metod

Termín odevzdání diplomové práce: 1.6.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Jiří Holub
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

V rámci diplomové práce je řešena problematika kultivací vybraných druhů karotenogenních kvasinek na odpadních produktech potravinářského průmyslu za pomoci laboratorního bioreaktoru. Buňky karotenogenních kvasinek produkují v průběhu kultivace velmi hodnotné metabolity nacházející se převážně v lipidické části buněk. Konkrétně jde o karotenoidy, ergosterol, koenzym Q a mastné kyseliny.

Práce je rozdělena na dvě hlavní části, teoretickou část, a praktickou část. V teoretické části jsou popsány jednotlivé druhy kvasinek, typy odpadních substrátů, zkoumané metabolity a metody jejich analýzy. V experimentální části je řešeno zpracování odpadních produktů potravinářského průmyslu, konkrétně živočišného tuku, syrovátky a kávové sedliny do podoby využitelných substrátů pro kultivaci kvasinek. Dále je řešena problematika kultivace se zaměřením na získání sledovaných metabolitů a jejich analýza pomocí HPLC/PDA a GC/FID.

Při práci byly využity kvasinkové rody *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 19-4-6), *Rhodotorula kratochvilae* (CCY 20-2-26), *Rhodospiridium toruloides* (CCY 062-002-001), *Sporidiobolus pararoseus* (CCY 19-9-6) a *Cystofilobasidium macerans* (CCY 10-1-2). Jako jeden z nejlepších kmenů byl vyhodnocen *Sporidiobolus pararoseus* (CCY 19-9-6), který dosahoval velmi vysokých produkci karotenoidů, koenzymu Q a ergosterolu.

Klíčová slova: karotenogenní kvasinky, kultivace, karotenoidy, ergosterol, koenzym Q, hydrolyzát, odpadní tuk, kávová sedlina, syrovátka

Abstract

The master thesis addresses the issue of cultivation of selected strains of carotenogenic yeasts on waste materials of the food industry using a laboratory bioreactor. Carotenogenic yeasts are able to produce highly valuable metabolites during cultivation, which are located predominantly in the lipid part of the cells. Particularly, they are carotenoids, ergosterol, coenzyme Q and fatty acids.

The thesis is divided into two main parts, the theoretical part and the practical part. The theoretical part describes individual yeast strains, types of waste materials, produced metabolites and methods of their analysis. The experimental part deals with the processing of waste materials of the food industry, specifically animal fat, whey and spent coffee grounds into the form of substrates usable as nutrition sources for yeast cultivation. Furthermore, cultivations focused on the recovery of the monitored metabolites and their analysis by using HPLC/PDA and GC/FID assemblies were studied as well.

The yeast strains *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 19-4-6), *Rhodotorula kratochvilae* (CCY 20-2-26), *Rhodospiridium toruloides* (CCY 062-002-001), *Sporidiobolus pararoseus* (CCY 19-9-6) and *Cystofilobasidium macerans* (CCY 10-1-2) were used in this work. As one of the best producing strains *Sporidiobolus pararoseus* (CCY 19-9-6) was found, which achieved very high productions of carotenoids, coenzyme Q and ergosterol.

Key words: carotenogenic yeasts, cultivation, carotenoids, ergosterol, coenzyme Q, hydrolyzate, waste fat, spent coffee grounds, whey

HOLUB, Jiří. Optimalizace kultivace karotenogenních kvasinek na směsných odpadních substrátech. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123930>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí své diplomové práce paní prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. a odbornému konzultantovi Ing. Martinu Szotkowskému za vedení, ochotu a pomoc při řešení problematiky. Dále bych rád poděkoval svým blízkým, za veškerou podporu v průběhu celého studia na vysoké škole.

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Teoretická část.....	11
2.1	Sledované metabolity.....	11
2.1.1	Karotenoidy.....	11
2.1.1.1	Struktura karotenoidů	11
2.1.1.2	Biosyntéza karotenoidů	12
2.1.2	Lipidy.....	14
2.1.2.1	Mastné kyseliny	15
2.1.2.2	Ergosterol.....	16
2.1.2.3	Ubichinony.....	18
2.2	Kvasinky	19
2.2.1	Cytologie kvasinek	19
2.2.2	Karotenogenní kvasinky	20
2.2.2.1	Rod Cystofilobasidium.....	20
2.2.2.2	Rod Rhodotorula	21
2.2.2.3	Rod Rhodosporidium	21
2.2.2.4	Rod Sporidiobolus.....	22
2.3	Odpadní substráty	23
2.3.1	Kávová sedlina	23
2.3.2	Syrovátka.....	24
2.3.3	Živočišný tuk.....	24
2.4	Kultivace	25
2.4.1	Růstová křivka.....	25
2.4.2	Kultivace kvasinek.....	26
2.4.3	Bioreaktor (fermentor).....	26
2.5	Analytické metody.....	27
2.5.1	Chromatografie.....	27
2.5.2	HPLC (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)	28

2.5.3	GC (plynová chromatografie)	28
2.5.4	Absorpční UV-VIS spektrofotometrie	29
3	Cíl práce	30
4	Experimentální část.....	31
4.1	Použité chemikálie.....	31
4.1.1	Chemikálie pro kultivaci kvasinek	31
4.1.2	Chemikálie pro extrakce a analýzy metabolitů na HPLC a GC	31
4.1.3	Chemikálie pro zpracování odpadních substrátů.....	31
4.2	Použité přístroje a pomůcky	31
4.2.1	Přístroje užívané pro kultivaci buněk	31
4.2.2	Přístroje a pomůcky užívané pro izolaci a analýzu metabolitů	32
4.2.3	Přístroje užívané ke zpracování odpadních substrátů	32
4.3	Materiál	32
4.3.1	Kmeny	32
4.3.2	Odpadní substráty	32
4.4	Zpracování odpadních substrátů.....	33
4.4.1	Zpracování kávové sedliny.....	33
4.4.1.1	Sušení a extrakce.....	33
4.4.1.2	Kyselá hydrolýza.....	33
4.4.1.3	Enzymatická hydrolýza	33
4.4.2	Zpracování syrovátky.....	33
4.4.3	Zpracování odpadního živočišného tuku	33
4.5	Kultivace vybraných kvasinkových kmenů	34
4.5.1	Inokulace	34
4.5.1.1	Metoda dvojí inokulace	34
4.5.1.2	Metoda jednoduché inokulace	34
4.5.2	Baňkové kultivace	35
4.5.3	Fermentor	35
4.5.3.1	Podmínky	35
4.5.3.2	Příprava produkčního média	36
4.5.3.3	Kultivace a odběry	36
4.6	Zpracování a analýza vzorků.....	37

4.6.1	Zpracování vzorku po odběru.....	37
4.6.1.1	Gravimetrické stanovení biomasy	37
4.6.1.2	Zpracování vzorku.....	37
4.6.2	Analýza sacharidů metodou HPLC/RI.....	37
4.6.3	Extrakce karotenoidů pro HPLC	37
4.6.4	Analýza karotenoidů metodou HPLC/PDA	38
4.6.5	Transesterifikace a extrakce mastných kyselin pro GC analýzu	38
4.6.6	Analýza mastných kyselin metodou GC/FID.....	39
5	Výsledky a diskuze	40
5.1	Stanovení růstových a produkčních vlastností kultur	40
5.1.1	Fermentorové kultivace na směsi tuku a syrovátkového hydrolyzátu.....	40
5.1.1.1	Produkční vlastnosti kmene <i>Sporodiobolus pararoseus</i>	41
5.1.1.2	Produkční vlastnosti kmene <i>Rhodotorula kratochvilae</i>	42
5.1.1.3	Produkční vlastnosti kmene <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	44
5.1.1.4	Produkční vlastnosti kmene <i>Cystofilobasidium macerans</i>	45
5.1.1.5	Produkční vlastnosti kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i>	46
5.1.2	Fermentorové kultivace na směsi tuku a kávového hydrolyzátu	48
5.1.2.1	Produkční vlastnosti kmene <i>Sporodiobolus pararoseus</i>	48
5.1.2.2	Produkční vlastnosti kmene <i>Rhodotorula kratochvilae</i>	49
5.1.2.3	Produkční vlastnosti kmene <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	51
5.1.2.4	Produkční vlastnosti kmene <i>Cystofilobasidium macerans</i>	52
5.1.2.5	Produkční vlastnosti kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i>	54
5.1.3	Fermentorová kultivace na směsi kávového oleje a kávového hydrolyzátu ...	56
5.1.4	Souhrnné srovnání produkčních charakteristik	58
5.1.4.1	Srovnání výsledků nejlepších odběrů v čase při kultivacích na směsi odpadního tuku a syrovátkového hydrolyzátu.....	58
5.1.4.2	Souhrn výsledků nejlepších odběrů v čase při kultivacích na směsi odpadního tuku a kávového hydrolyzátu	60
5.1.4.3	Srovnání výsledků kultivace na směsi kávového oleje a kávového hydrolyzátu s ostatními fermentorovými kultivacemi	62
6	Závěr	65
7	Literatura	67

8	Seznam použitých zkratek.....	72
---	-------------------------------	----

1 Úvod

Karotenogenní kvasinky produkují metabolity vhodné k využití ve farmaceutickém, potravinářském či krmivářském průmyslu, jelikož obsahují mnoho pro tělo zajímavých a potřebných látek, jako jsou karotenoidy, ergosterol, koenzym Q, či mastné kyseliny.

Při vysoké poptávce po vitamínech, potravinových doplncích či kosmetice obsahující jako složku zmíněné metabolity, je snaha o nalezení nových cest k levnější a efektivnější výrobě kýžených produktů. K jejich produkci, jak je řešeno v této práci, může být využita kultivace karotenogenních kvasinek na odpadních produktech z jiných, například potravinářských a zemědělských výrob. Odpadní materiály je vždy třeba zpracovat, i tak jsou ale zpravidla levnější než komplexní média.

Mezi odpadní produkty potravinářského průmyslu se řadí spousta materiálů, jež lze znovu použít pro další produkci. Například kávová sedlina, živočišný tuk či syrovátka mohou sloužit jako velmi bohatý zdroj uhlíkatých sloučenin využitelných biotechnologicky jako zdroje uhlíku a dusíku. Tyto odpadní produkty se po správné chemické předúpravě mohou stát kvalitními substráty pro produkci hodnotných metabolitů pomocí biotechnologické kultivace karotenogenních kvasinek. Z ekonomického a ekologického pohledu se jedná o žádaný jev, kdy se využívá princip biorafinerie, kde odpadní produkt z jedné biovýroby je vstupní surovinou pro výrobu jinou tak, aby byla minimalizována tvorba odpadu a podpořeno udržitelné a ekologické hospodářství.

2 Teoretická část

2.1 Sledované metabolity

2.1.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou přírodní lipofilní pigmenty rostlin a mikroorganismů, které se vyznačují červeným, oranžovým a žlutým zbarvením. Díky svému lipofilnímu charakteru se vyskytují v nepolárních částech buněk, převážně uvnitř membrán. Karotenoidy se podílejí na fotosyntéze jako doplňkové fotoaktivní pigmenty, jež dokáží absorbovat světlo při vlnových délkách mezi 450-550 nm a díky vysokému počtu dvojných vazeb se vyznačují vysokou antioxidační aktivitou. Ta se značnou měrou podílí na snížení oxidačního stresu a odchyty volných radikálů v prostředí buněk. Volné radikály mohou v buňkách působit trvalé změny v esenciálních sloučeninách, jako jsou nukleové kyseliny nebo bílkoviny, a vést tak k nežádoucím mutacím či smrti buňky. V živočišné říši plní karotenoidy mimo antioxidační funkce také funkci biosyntetickou, kde slouží jako prekurzory vitamínu A retinolu, jež je například zodpovědný za správnou funkci zraku [1].

2.1.1.1 Struktura karotenoidů

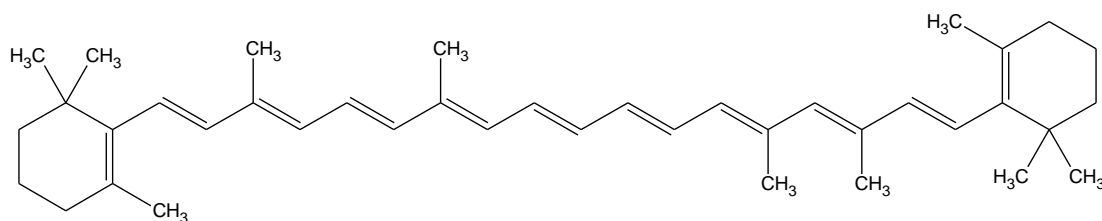
Karotenoidy se řadí mezi izoprenoidy, konkrétně mezi tetraterpeny, protože se skládají z 8 izoprenových jednotek. Jejich základní struktura obsahuje zpravidla 40 atomů v polyenovém řetězci. Charakteristické absorpční spektrum karotenoidů je způsobeno systémem až 15 konjugovaných vazeb polyenového řetězce, jež jsou ve většině případů v all-trans konfiguraci. Karotenoidy se na základě své prvkové kompozice rozdělují na dvě hlavní skupiny:

- Karoteny: Karoteny obsahují pouze nesubstituované uhlovodíkové řetězce. Dosahují červeného a oranžového zbarvení. Základním představitelem je lykopen (viz Obrázek 1), jež je alifatický karoten sloužící jako prekurzor pro zbývající karotenoidy. Při biosyntéze ostatních karotenů je lykopen podroben cyklizaci jednoho nebo obou konců řetězce. Na základě cyklizace se dále karotenoidy dělí na acyklické, monocyklické a dicyklické. Mezi další významné karoteny patří například β -karoten či torulen (viz Obrázek 1).
- Xantofyly: Xantofyly, vycházejí uhlovodíkovým skeletem z karotenů. V průběhu biosyntézy dochází k hydroxylaci či oxidaci molekuly. Díky tomu mají xantofyly, kromě uhlovodíkového základu, na svém řetězci navázaný alespoň jeden atom kyslíku. Mezi významné zástupce xantofylů patří například torularhodin (viz Obrázek 1) či lutein.

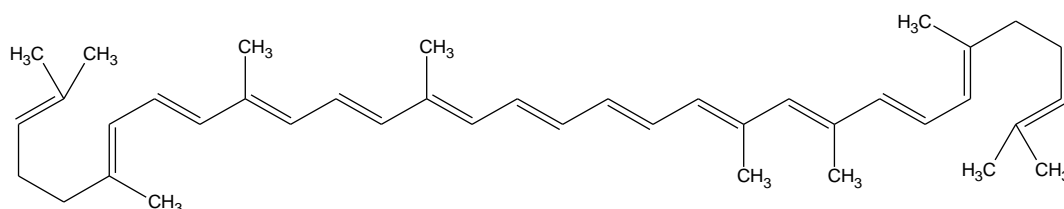
Karotenoidy se dále dělí dle stupně cyklizace na polyenový řetězec na:

- Acyklické, jsou karotenoidy, jež ve svém řetězci neobsahují žádný cyklus. Jako příklady mohou sloužit lykopen, δ -karoten či neurosporen.
- Monocyklické, jsou karotenoidy mající na jednom ze svých konců cyklickou strukturu, jako například γ -karoten, torulen nebo tolularhodin.
- Dicyklické karotenoidy jsou z obou stran polyenového řetězce zakončeny cykly, jejichž nejvýznamnějším zástupcem je β -karoten [2], [3], [4].

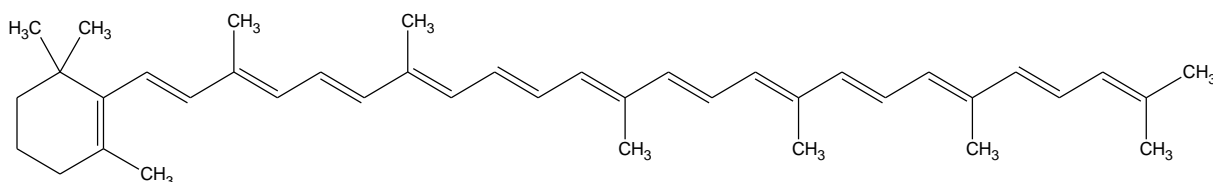
β -karoten:



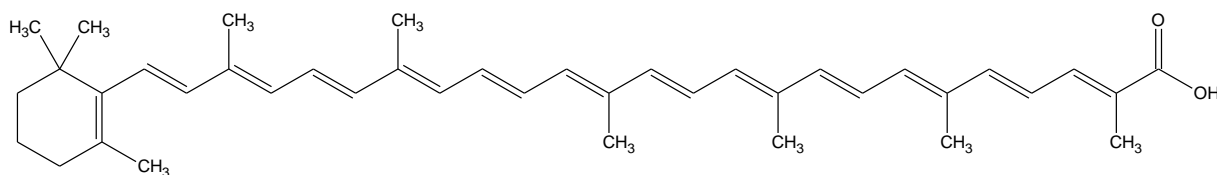
Lykopen:



Torulen:



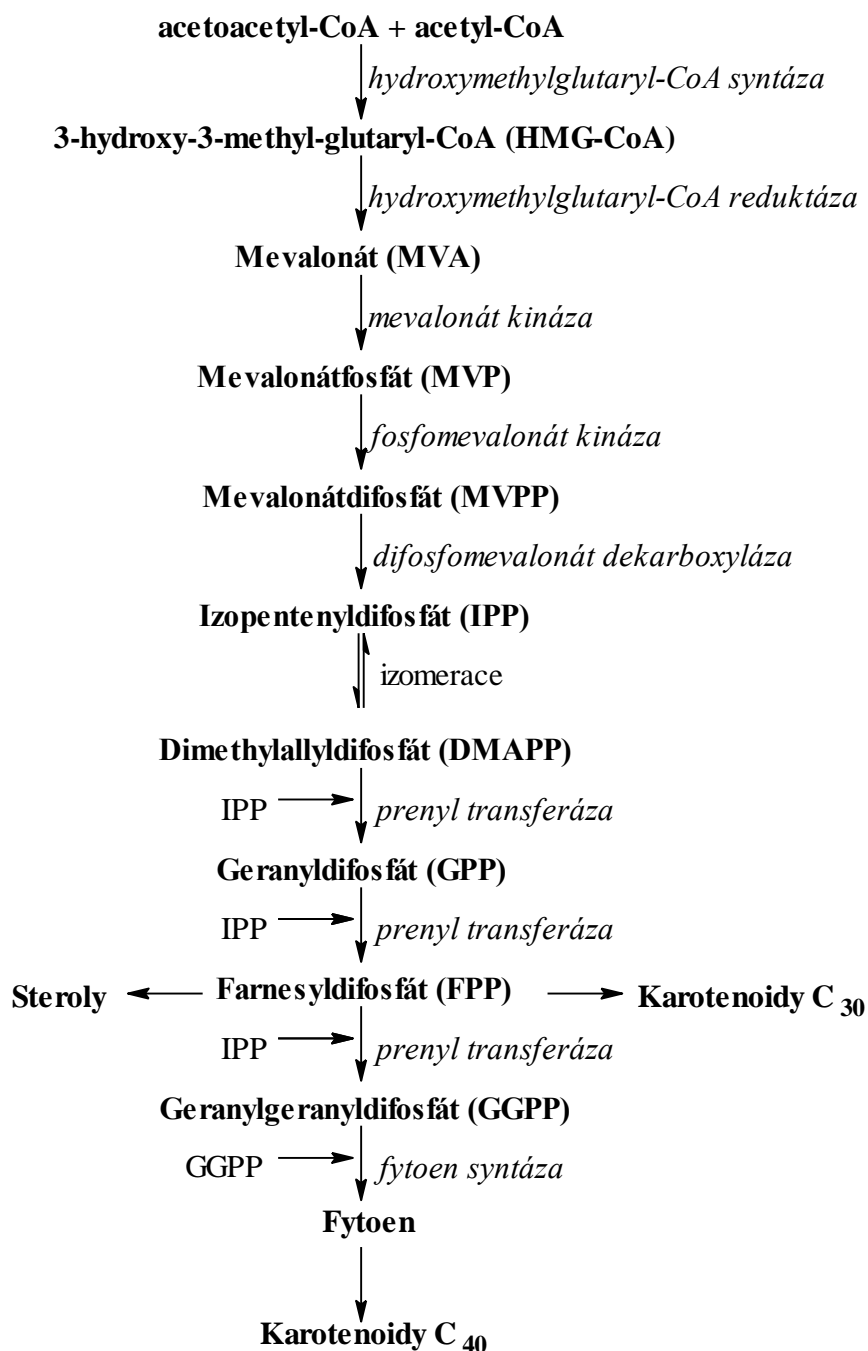
Torularhodin:



Obrázek 1: Příklady struktur konkrétních karotenoidů.

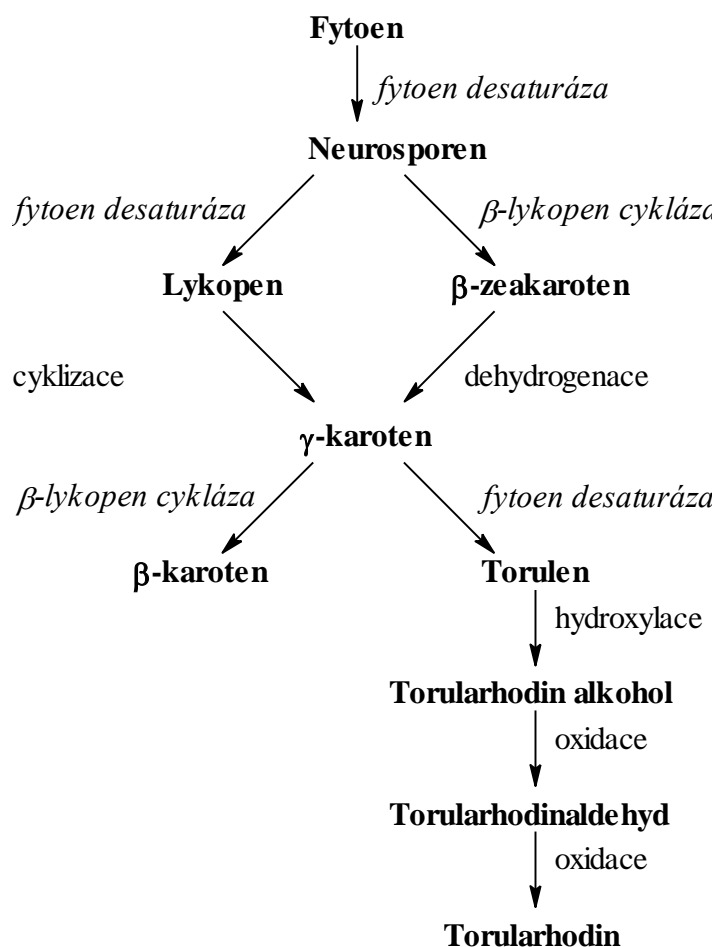
2.1.1.2 Biosyntéza karotenoidů

Karotenoidy se syntetizují v buňkách dráhou kyseliny mevalonové. Princip spočívá v postupné kondenzaci dvou-uhlíkatých acetylů ve formě acetyl-CoA, získaného z glykolýzy nebo z β -oxidace mastných kyselin. Nejprve vzniká acetoacetát, jenž při kondenzaci s dalším acetyl-CoA formuje 3-hydroxy-3methyl-glutaryl-CoA, který je následnou redukcí přeměněn na mevalonát. Ten je předstupněm izopentenylidifosfátu neboli tzv. „aktivní izoprenové jednotky“, která vzniká dekarboxylací mevalonátu a jeho dvojitou fosforylací. Aktivní izoprenové jednotky jsou mezi sebou spojovány způsobem „hlava-pata“, přičemž je formován geranyldifosfát, který kondenzuje se dvěma molekulami izopentenylidifosfátu za tvorby meziproductu farnesyldifosfátu a finálního produktu geranygeranyldifosfátu. Dvě molekuly geranygeranyldifosfátu se redukční kondenzací spojují způsobem „pata-pata“ za vzniku fytoenu, který je nejjednodušším C_{40} karotenoidem. Syntézu znázorňuje schéma na Obrázku 2 [5], [6].



Obrázek 2: Schéma syntézy karotenoidů cestou kyseliny mevalonové [7] .

V červených kvasinkách se v nejvyšší míře vyskytují karotenoidy typu: β -karoten, torulen a torularhodin. Jejich syntéza vede přes fytoen, který je podroben dehydrogenaci na neurosporen a posléze na lykopen, jenž je pomocí cyklázy převeden na monocyklický γ -karoten. Ke γ -karotenu vede cesta i přes dehydrogenaci β -zeakarotenu, který je produktem cyklizace neurosporenu. β -karoten vzniká jako produkt cyklizace γ -karotenu pomocí katalýzy β -lykopen cyklázy. γ -karoten dále slouží jako prekurzor pro biosyntézu torulenu, který si zachovává monocyklický charakter molekuly, ale zvyšuje se její nenasycenost pomocí desaturázy. Dalšími hydroxylacemi a oxidačními modifikacemi torulenu se lze dostat až k torularhodinu, viz schéma na Obrázku 3 [6], [7].



Obrázek 3: Schéma biosyntézy β -karotenu, torulenu a torularhodinu [7].

2.1.2 Lipidy

Skupinou lipidů se rozumí široká škála sloučenin přímo či nepřímo souvisejících s mastnými kyselinami. Vyznačují se velmi špatnou rozpustností ve vodě a vysokou rozpustností v polárních solventech. V organismech lipidy plní mnoho nezastupitelných funkcí:

- **Zásobní:** Lipidy slouží jako zásobní látky chemické energie buněk. Energie se do lipidů ukládá v podobě mastných kyselin navázaných v triacylglycerolech. Při konzervaci se mastné kyseliny biosyntetizují za vysoké saturace organismu živinami, při nedostatku živin organismus lipidické zásoby odbourává pomocí β -oxidace.
- **Stavební:** Lipidy rovněž slouží jako stavební látky organismů. Konkrétním příkladem je formování biomembrán, jež jsou esenciální pro přežití buněk. Biomembrány se zpravidla skládají z fosfolipidů (fosfoacylglyceroly a sfingomyeliny), glykosfingolipidů (cerebrosidy a gangliosidy) a sterolů (cholesterol).
- **Metabolická:** Pod metabolickou funkcí si lze představit možnost využití nepolárních látek, pro něž slouží lipidy jako rozpouštědla, hlavně lipofilních vitamínů (A, D, E, K) a hormonů.

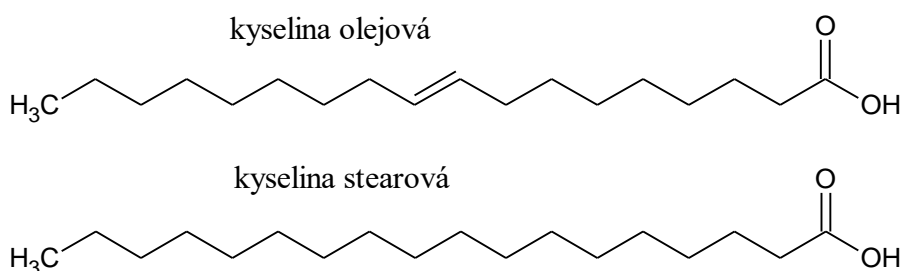
- Ochranná: Lipidy, zvláště u vyšších organismů v podobě tukových tkání, plní termoisolační případně mechanicky-ochrannou funkci.

Lipidy se dále dělí podle složení na:

- Jednoduché lipidy: Jedná se o mastné kyseliny, jež jsou esterově vázané na alkohol. V případě tuků a olejů je alkoholem míněn glycerol. U vosků se jedná o estery mastných kyselin a vyšších monofunkčních alkoholů.
- Složené lipidy: Jsou to lipidy, které obsahují na alkoholu mimo esterově vázaných mastných kyselin navázanou i skupinu jinou. Hlavní skupiny složených lipidů jsou fosfolipidy a glykolipidy a ostatní složené lipidy, do nichž se řadí například lipoproteiny, sulfolipidy či aminolipidy.
- Odvozené lipidy a prekurzory: Jedná se o rozmanitou skupinu látek, jež mají společný lipofilní charakter, konkrétně se jedná o steroidy, alkoholy, nepolární vitamíny, hormony, mastné kyseliny, glycerol, mastné aldehydy a ketolátky [8].

2.1.2.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou nedílnou součástí organismů. Jedná se o organické kyseliny s uhlíkatým řetězcem o délce 4 až 26 atomů s různým stupněm nenasycenosti. Příkladem nasycené mastné kyseliny je kyselina stearová (18:0), přičemž jejím mono-nenasyceným ekvivalentem je kyselina olejová (18:1^{Δ9}), viz Obrázek 4. Kvasinky produkují výhradně mastné kyseliny se sudým počtem uhlíků. Pro produkci mastných kyselin je důležité mít dostatečné množství acetyl-CoA, který se získává z živin bohatých na uhlík, např. cukry a tuky. Biosyntéza mastných kyselin probíhá intenzivněji za dostatečné saturace organismu živinami [4].



Obrázek 4: strukturní vzorce kyselin olejové a stearové

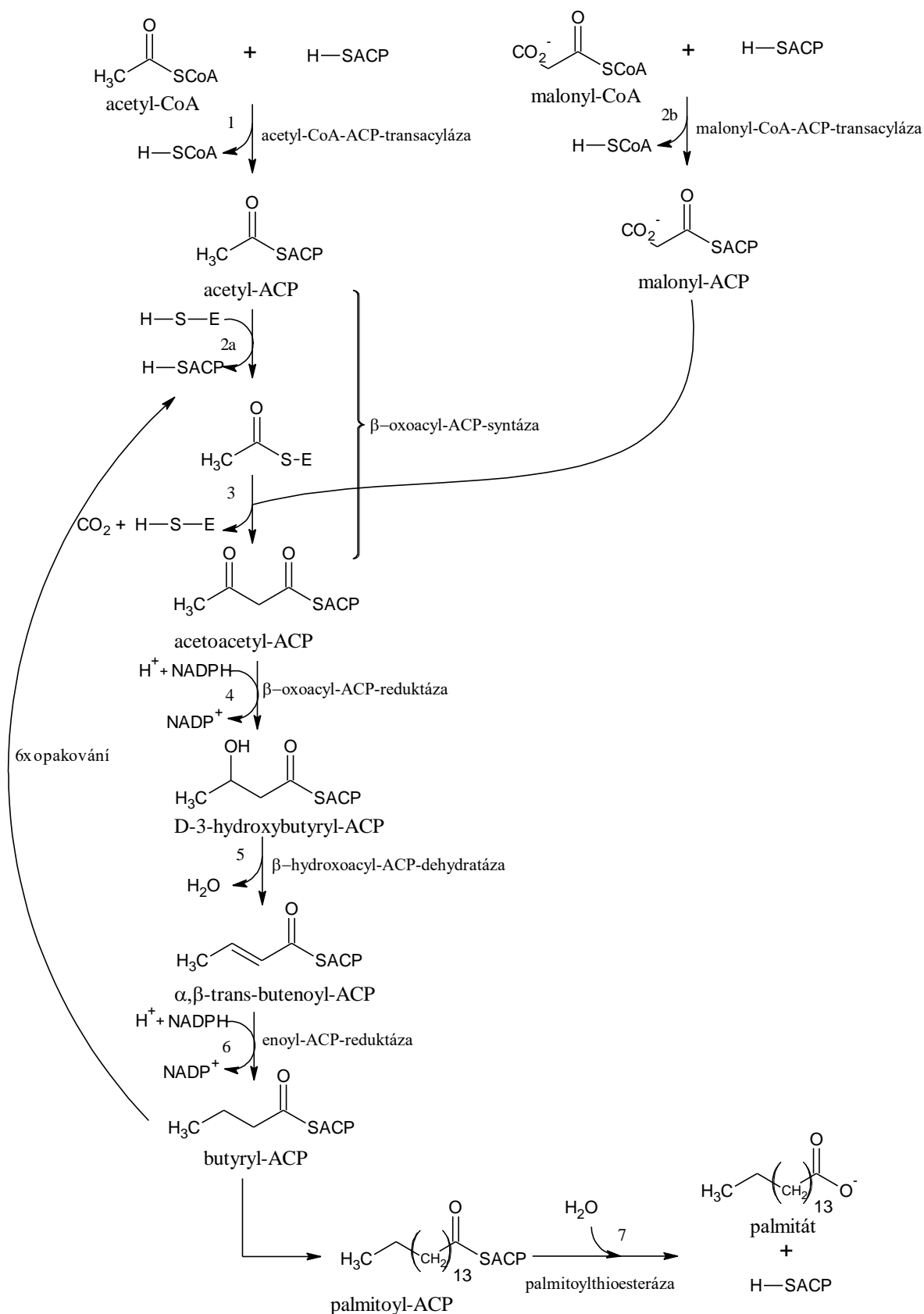
Biosyntéza mastných kyselin probíhá v cytosolu buněk, konkrétně v endoplazmatickém retikulu, kde sídlí enzymové komplexy odpovídající za jednotlivé kroky biosyntézy. Díky enzymovým komplexům, na sebe jednotlivé reakce navazují a reakce probíhá s vysokou účinností. Multienzymový komplex se skládá ze dvou podjednotek, jež jsou spojeny disulfidickým můstkem. První trojici enzymů tvoří acetyl-transacyláza, malonyl-transacyláza a β -oxoacyl-syntáza. Acetyl-transacyláza katalyzuje vznik acetyl-ACP, malonyl-transacyláza umožňuje vznik malonyl-ACP a β -oxoacyl-syntáza katalyzuje syntézu acetoacetyl-ACP z malonyl-ACP a acetyl-ACP za současné dekarboxylace malonyl-ACP. Při katalýze další trojice enzymů (β -oxoacyl-reduktáza, β -hydroxyacyl-dehydratáza, enoyl-reduktáza) se formuje butyryl-ACP způsobem,

při kterém β -oxoacyl-reduktáza redukuje acetoacetyl-ACP za pomoci redukčního koenzymu $\text{NADPH}^+ + \text{H}$ na D-3-hydroxybutyryl-ACP, který je dále podroben dehydrataci za pomoci enzymu β -hydroxyacyl-dehydratáza za vzniku α,β -trans-butenoyl-ACP, jenž je redukován pomocí enoyl-reduktázy a redukčního koenzymu $\text{NADPH}^+ + \text{H}$ na již zmíněný butyryl-ACP. Takto vzniklý acyl se v rámci reakčního řetězce transportuje pro další elongaci k zpracování enzymem β -oxoacyl-syntázou (reakce 2a a 3 z Obrázku 5). Cyklus prodlužování acylu se opakuje tolikrát, dokud není dosaženo požadované délky acylu (obvykle C16). Aby se finální acyl stal mastnou kyselinou, je acyl podroben působení enzymu acylesterázy, jež naváže vodu a odštěpí ACP. Kompletní schéma biosyntézy palmitátu lze najít na Obrázku 5. Nenasycené mastné kyseliny jsou biosyntetizovány z nasycených mastných kyselin pomocí desaturáz [4], [8].

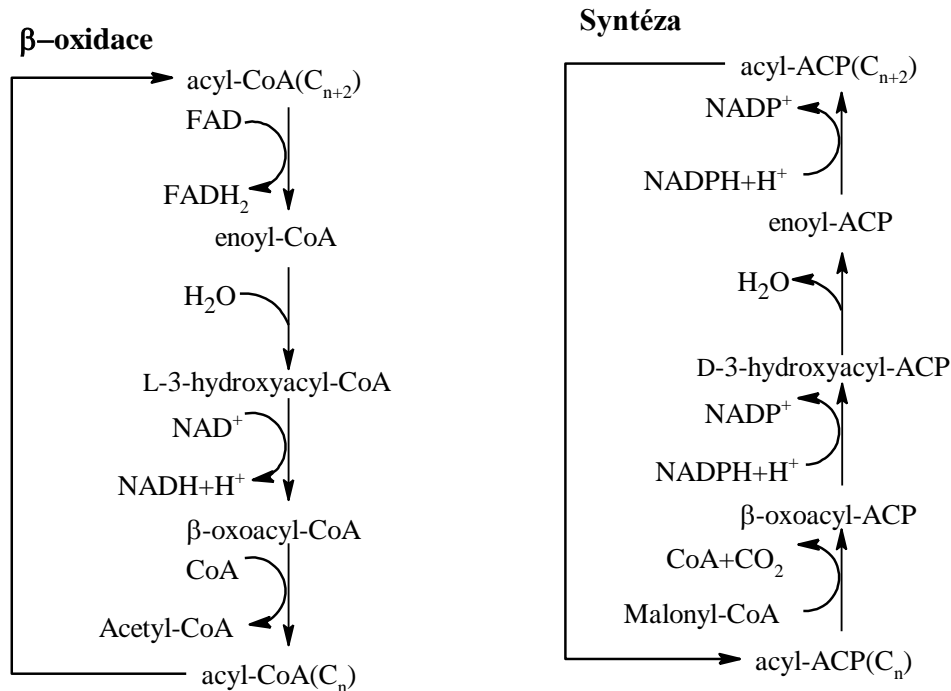
Mastné kyseliny jsou velmi bohatý zdroj energie, proto je důležité zmínit i opačnou metabolickou dráhu vedoucí k jejich odbourání, která se nazývá β -oxidace, nebo také Lynenova spirála. Na rozdíl od biosyntézy se β -oxidace uskutečňuje v mitochondriální matrix, do které se mastné kyseliny transportují pomocí karnitinového transportního systému přes mitochondriální membránu. Spočívá v aktivaci mastné kyseliny pomocí koenzymu A navázaného místo hydroxylové skupiny na karboxylovém uhlíku. Aktivace je katalyzována enzymem acyl-CoA-syntázou a je umožněna pouze za spotřeby energie z ATP. V principu lze říci, že β -oxidace je otočená biosyntéza, jelikož se při ní acyl oxiduje a postupně zkracuje o dvou-uhlíkaté acetyly. Acyl-CoA (C_{n+2}) je nejprve dehydrogenován pomocí acyl-CoA-dehydrogenázy a oxidačního koenzymu FAD, vniká enoyl-CoA. Enoyl-CoA je podroben hydrataci pomocí enoyl-CoA-hydratázy a vzniklý L-3-hydroxyacyl-CoA je následně dehydrogenován enzymem β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenázou za vzniku β -oxoacyl-CoA, od něhož je odštěpen acetyl-CoA za vzniku acyl-CoA(C_n). Zjednodušené schéma β -oxidace a biosyntézy mastných kyselin je pro srovnání znázorněno na Obrázku 6 [8], [9].

2.1.2.2 Ergosterol

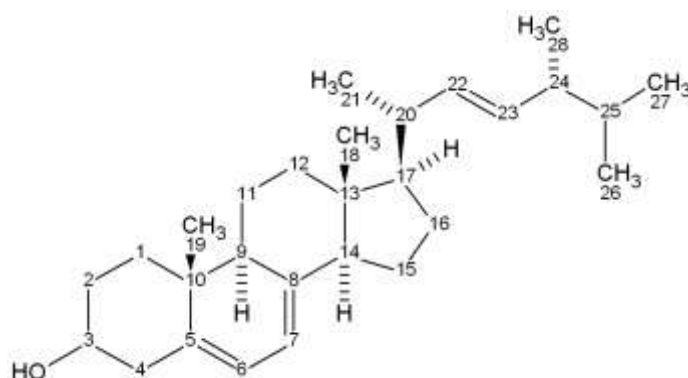
Ergosterol je lipidická nepolární látka vyskytující se v houbách a kvasinkách (viz Obrázek 7). Jedná se o kvasinkový ekvivalent cholesterolu, který slouží jako prekurzor vitamínu D₂ ergokalciferolu. Biologickou funkcí ergosterolu se rozumí zajišťování fluidity a permeability membrán a aktivity membránových enzymů. U kvasinek působí v cytosolu jako regulátor proteinkinázy, jež je potřebná k iniciaci růstu. Při biosyntéze ergosterolu je nutné dodržet striktně aerobní podmínky. Fakultativně anaerobní organizmy se za nepřístupu kyslíku stanou auxotrofními k produkci ergosterolu. Vzhledem k výskytu ergosterolu v houbách, konkrétně plísňích, slouží jako indikační látka kontaminace potravin. Ozařováním UV-světlem se u ergosterolu rozpojí B kruh mezi polohami 9 a 10 a dojde k utvoření ergokalciferolu, který se používá jako vitaminový fortifikátor mléka, či potravinový doplněk [10], [11], [12].



Obrázek 5: Schéma syntézy mastných kyselin, konkrétně kyseliny palmitové [10].



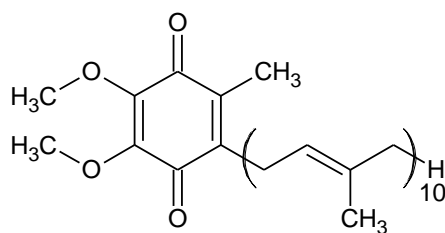
Obrázek 6: Schémata β -oxidace a biosyntézy mastných kyselin [9].



Obrázek 7: Strukturní vzorec ergosterolu [11].

2.1.2.3 Ubichinony

Jinak také koenzymy Q jsou charakteristická skupina látek, která obsahuje na benzochinonovém jádru navázaný izoprenový řetězec, jehož délka je specifická pro dané typy organismů. Příkladem je koenzym Q10, který má na chinonovém jádru navázaný zbytek složený z deseti izoprenových jednotek (viz Obrázek 8). Koenzymy Q mají funkci přenašeče vodíku a elektronů v rámci dýchacího řetězce, přičemž propojují jak NADH, tak i flavoproteiny s cytochromem b. Koenzymy Q jsou za aerobních podmínek v chinonovém stavu a při přechodu do anaerobních podmínek se redukují na chinoly. Dále se společně vyskytují s vitamínem E v lipidických částech buněk, kde zabraňují peroxidaci lipidů [8], [13],



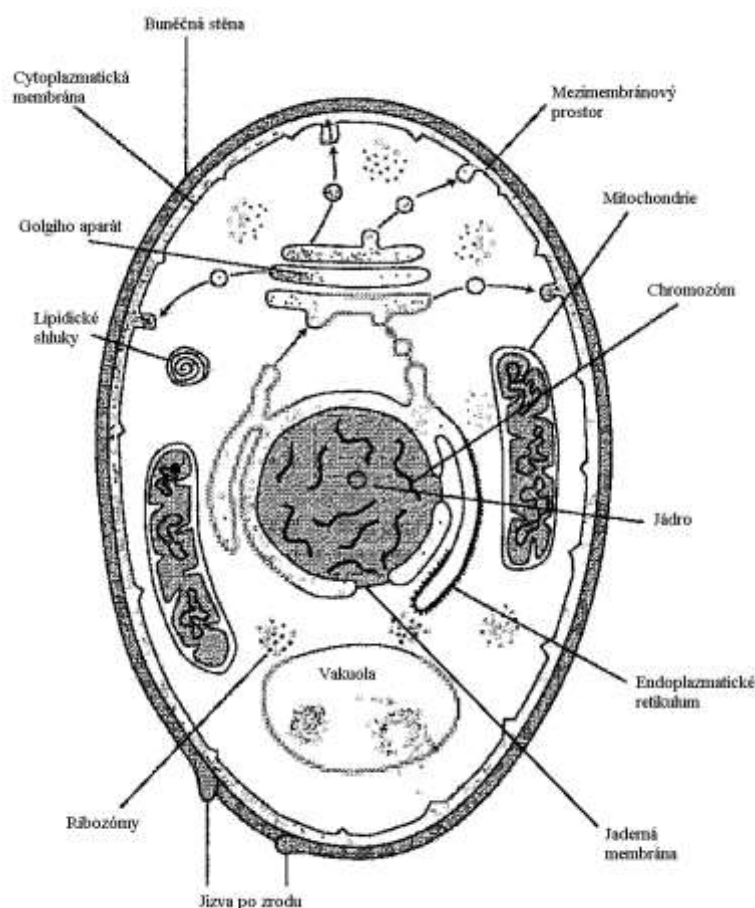
Obrázek 8: Strukturní vzorec koenzymu Q10.

2.2 Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotické chemoorganotrofní mikroorganismy, spadající do říše hub. Jsou schopné rozmnožovat se pohlavně (sporami) a nepohlavně (dělením či pučením), přičemž je preferován nepohlavní způsob rozmnožování. Mají buňky kulovitého až elipsovitého tvaru. Kvasinky mají schopnost se shlukovat do větších celků (kolonií), nebo tvořit pseudomycelia. Díky adaptačním schopnostem lze kvasinky nalézt téměř na celém povrchu planety. Jsou hojně využívány v průmyslu a potravinářství jak díky hodnotným metabolitům, tak i kvůli biomase [14], [15].

2.2.1 Cytologie kvasinek

Kvasinky mají eukaryotický typ buňky. Na povrchu buňky se nachází buněčná stěna. Je to porézní struktura skládající se převážně z polysacharidů, která udává buňce tvar a zabraňuje osmotickému šoku. Pod buněčnou stěnou se nachází cytoplazmatická membrána, jež je složená z lipidové dvojvrstvy a membránových proteinů. Slouží k regulaci osmotického tlaku a výměně látek s okolním prostředím. Vnitřní výplň buňky se nazývá cytoplazma, v níž se nacházejí jednotlivé organely. Součástí cytoplazmy je buněčná tekutina cytosol. Důležitou organelou z pohledu proteosyntézy je endoplazmatické retikulum. Jedná se o systém membrán obsazený z vnější strany ribozomy a zároveň obsahuje enzymy a zásobní látky. Další důležitou organelou jsou mitochondrie, jež zodpovídají za energetický chod buňky. Jde o tvarově rozmanitou organelu složenou převážně z lipidů, bílkovin a fosfolipidů, v níž dochází k odbourávání mastných kyselin a citrátovému cyklu. Zároveň se zde nachází systém dýchacích enzymů. Díky obsahu malého množství DNA, jsou mitochondrie nositelkami mimojaderné dědičnosti. Zásobní funkci v buňkách plní vakuoly. Jedná se o měchýřky obklopené membránou obsahující zásobní látky a metabolity, jež vznikají v průběhu života buňky. Mohou obsahovat prekursor enzymů a ostatních látek, které se zrovna neúčastní metabolismu. Velikost vakuol souvisí se stářím buňky. Mladé buňky obsahují více menších vakuol, zatímco starší buňky mohou být vakuolou téměř zcela vyplněné. Řídicím centrem kvasinkové buňky je jádro, jehož lokace je zhruba v jejím středu. Jádro je od zbytku cytosolu odděleno dvojitou jadernou membránou se znatelnými póry. Uvnitř jádra se nachází genetická informace v podobě chromozomů, jadérko, které se nachází pod jadernou membránou a pólové tělísko vřeténka, jež má diskovitý tvar a slouží k rozdělení zdvojených chromozomů při dělení jádra v průběhu buněčného rozmnožování. Schéma buňky viz Obrázek 9 [16].



Obrázek 9: schéma kvasinkové buňky [17].

2.2.2 Karotenogenní kvasinky

Karotenogenní kvasinky jsou nesourodá skupina nepříbuzných kvasinek a nižších hub se schopností produkce a akumulace karotenoidních barviv, jako je β -karoten, lykopen, torulen, či torularhodin. Velmi dobře prozkoumané a známé karotenogenní rody se řadí hlavně do oddělení *Basidiomycota* a jsou to rody *Cystofilobasidium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* či *Phaffia*. V rámci práce zkoumané rody jsou popsány dále [18] [19].

2.2.2.1 Rod *Cystofilobasidium*

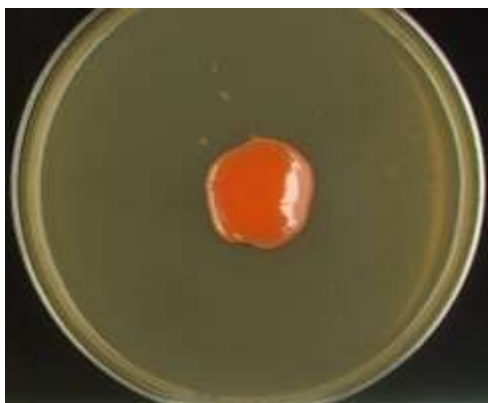
Kvasinky rodu *Cystofilobasidium*, se množí vegetativně i pohlavně a jsou schopny ojedinele zkvašovat cukry. Nepohlavní rozmnožování se děje přes polární pučení haploidních či diploidních buněk. Vytváří kolonie oranžového, lososového či skořicového zbarvení s lesklým povrchem. Buňky mají tvar protáhlého oválu a jsou schopné u některých druhů formovat pseudohyfy. V rámci pohlavního rozmnožování mohou utvořit pravé mycelium, netvoří však bazidiokarp. Produkují teliospory a mohou formovat i endospory. Vytvářejí jednobuněčná bazidia. Zástupci tohoto rodu jsou například *Cystofilobasidium macerans* (viz Obrázek 10) a *Cystofilobasidium infirmominiatum* [20].



Obrázek 10: Kolonie kvasinky *Cryptococcus macerans* (asexuální forma rodu *Cystofilobasidium macerans*) [21] .

2.2.2.2 Rod *Rhodotorula*

Rod obsahuje tři hlavní kmeny *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta* a *Rhodotorula mucilaginosa* (viz Obrázek 11). Jedná se o převážně mezofilní mikroorganismy. Kvasinky rodu *Rhodotorula* neumí zkvašovat cukry a mají velmi dobře vyvinutý pentózový cyklus. V průběhu exponenciální fáze růstu jsou schopné produkovat glykogen. Dále pak produkují směs karotenoidních barviv, skládající se převážně z β -karotenu, torulenu a torularhodinu. Vytváří rychle rostoucí, hladké, matné či slizovitě lesklé kolonie. Díky vyššímu obsahu karotenoidních barviv nabývají kolonie krémově růžové, červené až žluté barvy. Buňky jsou kulatého až protáhle oválného tvaru. Rozmnožují se pomocí multilaterálního či polárního pučení, produkují pseudomycelium a jsou schopné pohlavního rozmnožování pomocí teliospor [18], [20], [22], [23].



Obrázek 11: kolonie kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* [24].

2.2.2.3 Rod *Rhodosporidium*

Díky vyšším koncentracím karotenoidů se kolonie buněk rodu *Rhodosporidium* zbarvují do odstínu červené, oranžové a žluté. Dále byla v buňkách zaznamenána zvýšená produkce koenzymů Q9 a Q10. Kmeny se mohou vyskytovat v myceliální i kvasinkové podobě. Jako kvasinky

tvoří vejčité buňky, které se rozmnožují pomocí pučení, přičemž mohou tvořit pseudomycelium. Pohlavní rozmnožování je jak homotalické tak heterotalické. V heterotalickém systému se konjugací pohlavních buněk tvoří dikaryotické mycelium. Vytváří se teliospory, v nichž dochází ke karyogamii. V průběhu meiotického klíčení teliospor dochází k tvorbě koncových a bočních bazidií. V homotalickém systému dochází k tvorbě teliospor z jedné diploidní buňky. Redukčním dělením se vytváří dikaryotické mycelium, jež vyúsťuje v teliosporu, ve které probíhá karyogamie. Klíčením teliospor vznikají diploidní bazidiospory. Rod *Rhodosporidium* je perfektní formou rodu *Rhodotorula*. Rovněž jako u rodu *Rhodotorula* je rod *Rhodosporidium* striktně aerobní, tudíž není schopen fermentovat cukry, dále také není schopný zpracovávat laktózu. Mezi zástupce zmíněného rodu patří *Rhodosporidium toruloides* (viz Obrázek 12) či *Rhodosporidium babjevae* [16], [20].



Obrázek 12: Kolonie kvasinky *Rhodosporidium toruloides* [25].

2.2.2.4 Rod *Sporidiobolus*

Rod *Sporidiobolus* je perfektní stadium rodu *Sporobolomyces*. Buňky jsou vejčitého, elipsoidního až válcovitého tvaru a kolonie jsou ploché až vypouklé a na povrchu hladké až rýhované. Rod *Sporidiobolus* se vyznačuje karotenogenezí za vyšší produkce β -karotenu, torulenu a torularhodinu, tudíž jeho kolonie nabývají odstínů růžové, červené až žluté. Dále se rod vyznačuje formováním teliospor. Některé druhy jsou schopny tvořit pravé mycelium. Buňky rodu *Sporidiobolus* mohou nabývat forem pseudohyf a hyf na nichž se utvářejí blastokonidie. Zástupci tohoto rodu nejsou schopni zkvašovat cukry. Patří sem například *Sporidiobolus pararo-seus* či *Sporidiobolus salmonicolor* (viz Obrázek 13) [16], [20], [26], [14].



Obrázek 13: Kolonie kmene *Sporidiobolus pararoseus* na agarové plotně [27].

2.3 Odpadní substráty

Pro svůj růst a produkci metabolitů potřebují kvasinky dostatek materiálu v podobě uhlíkatého a dusíkatého substrátu v kombinaci s ostatními látkami. S tímto ohledem lze pohlížet na mnohé odpady z potravinářského průmyslu jako na znovu využitelné odpadní substráty, neboť jsou bohaté na zdroje organického uhlíku a často mohou sloužit i jako komplexní zdroj živin. Biotechnologické využití mikroorganismů se tak jeví jako vhodná cesta pro valorizaci odpadů, také díky jejich relativně nízké ceně a někdy i komplikovanému zpracování jiným způsobem.

2.3.1 Káвовá sedlina

Káva je jedním z nejkonsumovanějších nápojů na světě. Produkce kávy ročně vytvoří až 6 milionů tun odpadu v celosvětovém měřítku. Pro výrobu instantních kávových nápojů se musí nejdříve upražená kávová zrna pomlít na surový kávový prach, který se extrahuje do horké vody. Při extrakci do vody se složky vyluhují do vodní fáze a pevný zbytek po extrakci se nazývá kávová sedlina (složení viz Tabulka 1). Kávovou sedlinu lze využít jako palivo do průmyslových ohříváčů, takto se nejčastěji využívá ve zpracovatelském průmyslu kávy. Kávová sedlina je ve velkých množstvích obtížně zpracovatelná v kompostech kvůli reziduálním koncentracím kofeinu, antimikrobiálních látek a polyfenolů, které jsou pro půdu toxické, a kvůli vysoké náročnosti na kyslík může docházet k samovznícení. Kávová sedlina obsahuje 10 až 20 % kávového oleje, kterého je možné po extrakci nepolárními rozpouštědly využít pro tvorbu biopaliv, konkrétně biodieselu, který může dosahovat vyššího cetanového čísla než diesel vyrobený z ropy. Kávová sedlina se téměř z 50 % skládá z celulózy a hemicelulózy, které mohou být hodnotným uhlíkatým zdrojem, jelikož jsou bohaté na glukózu, arabinózu, manózu a galaktózu. Pro zpřístupnění uhlíku v polysacharidech pro mikroorganismy je nutné kávovou sedlinu podrobit kyselé hydrolyze, při níž se lze dostat až k 85% rozložení celulózy a hemicelulózy, přičemž se na kávovou sedlinu musí působit teplotou okolo 167 °C po dobu 45 minut. Možná šetrnější alternativa vede přes hydrolyzu pomocí enzymů celuláz a hemiceluláz, jejichž aktivita je nejvyšší při teplotě okolo 55 °C [28], [29], [30], [31], [32].

Tabulka 1: Složení kávové sedliny (obsah složek vyjádřen ve hmotnostních procentech) [28].

Složka	Obsažené množství (hm%)
Celulóza	8,6-13,3
Hemicelulóza	30-40
Proteiny	6,7-13,6
Olej	10-20
Lignin	25-33
Polyfenoly	2,5
Kofein	0,02

2.3.2 Syrovátka

Syrovátka je odpadní produkt při výrobě sýra. Obsahuje značné množství uhlíkatého zdroje ve formě laktózy, která ovšem není utilizovatelná karotenogenními kvasinkami. Syrovátka se musí nejprve podrobit enzymatické hydrolyze pomocí komerčně dostupných laktáz. Ty laktózu v syrovátce rozštěpí na glukózu a galaktózu, které jsou již kvasinkami využitelné. Syrovátka se dělí na dva typy, na kyselou, která má pH do hodnoty 5,1 a vzniká při výrobě tvarohů či sýrů typu cottage. Druhým typem je sladká syrovátka s pH pohybujícím se okolo hodnoty 6, která vzniká při výrobě tvrdých a polotvrdých sýru např. ementál, eidam, či čedar. Složení syrovátky viz Tabulka 2. Syrovátka se rovněž používá pro výrobu syrovátkového proteinu, který se získává několikanásobnou membránovou filtrací a poté sušením. Syrovátkový protein se hojně používá v potravinářském průmyslu, případně jako potravinový doplněk. Syrovátka se používá také v krmivářství jako komplexní zdroj živin [33], [34], [35].

Tabulka 2: Typy syrovátky a jejich složení [35].

Typ syrovátky	Protein (g/l)	Laktóza (g/l)	Minerální látky (g/l)
Sladká syrovátka	6-10	46-52	2,5-4,7
Kyselé syrovátka	6-8	44-46	4,3-7,2

2.3.3 Živočišný tuk

Tuky jsou estery mastných kyselin a glycerolu, které jsou rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Odpadní živočišný tuk je produktem kafilerního zpracování hmoty z těl zvířat. Rozložení mastných kyselin a lipofilních látek v tuku je závislé na daném živočichu, složení jeho potravy a původu. Například nazelenalá barva tuku vypovídá o přítomnosti chlorofylu, jenž se ukládá do tukové tkáně býložravců (složení loje býložravců vyobrazuje Tabulka 3). Odpadní tuk z kafilerii lze zpracovávat více způsoby, zahrnujícími jeho spalování ve spalovnách, transesterifikaci spojenou s výrobou biopaliv, biotechnologické využití jako substrátu, či použití v kr-

mivářství. Tuk, jenž může být zpracován pro biotechnologické a krmivářské účely, musí splňovat podmínku nepatogenního a netoxického původu, jelikož produkty z biotechnologického zpracování tuku lze potenciálně využít v lidském potravním řetězci [36], [37].

Tabulka 3: Procentuální zastoupení mastných kyselin v loji býložravců [36].

Mastná kyselina	Obvyklé zastoupení (%)	Možné rozpětí (%)
C-12:0 Laureová	0,2	<0,2
C-14:0 Myristová	0,4	1,4 až 7,8
C-14:1 Myristoleová	0,5	0,5 až 1,5
C-15:0 Pentadekanová	1	0,5 až 1,0
C-16:0 Palmitová	24,3	17,0 až 37,0
C-16:1 Palmitoleová	2,5	0,7 až 8,8
C-16:2 Hexadekadienová	—	<1,0
C-17:0 Margarová	2,1	0,5 až 2,0
C-17:1 Margaroleová	1,3	<1,0
C-18:0 Stearová	21,4	6,0 až 40,0
C-18:1 Oleová	33,6	26,0 až 50,0
C-18:1 Vakcenová	4,9	3,4 až 6,2
C-18:2 Linolová	1,6	0,5 až 5,0
C-18:2 (trans izomer)	1,1	0,6 až 1,7
C-18:2 Rumeniová	0,9	0,6 až 1,8
C-18:3 Linolenová	0,6	<2,5
C-20:0 Arachidová	0,2	<0,5
C-20:1 Gadoleová	0,1	<0,5

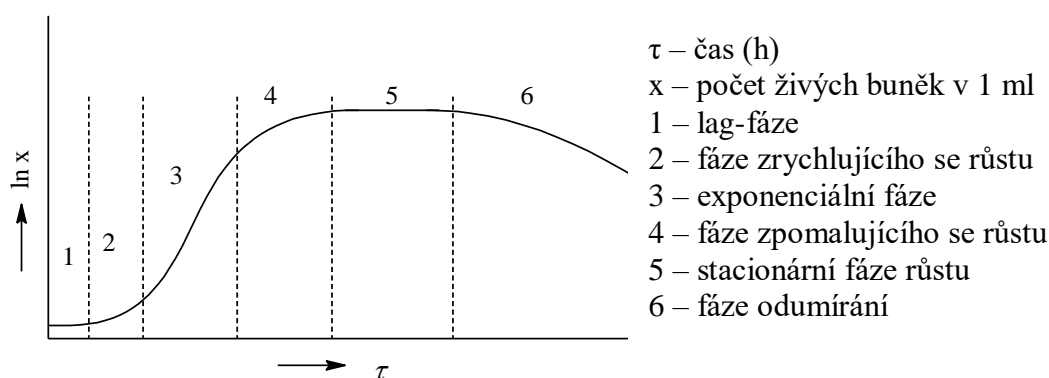
2.4 Kultivace

Mikroorganismy se za vhodných podmínek množí velmi rychle, a proto je důležité zajistit propagovaným mikroorganismům vhodné prostředí pro jejich množení. Základní podmínkou pro růst kultury je zajištění dostatečného přísunu živin, pro výrobu energie a buněčných struktur. V případě kvasinek se jedná o uhlíkatý a dusíkatý substrát s přidanými zdroji fosforu a síry. Ve vsádkovém médiu s dostatečnou koncentrací živin se začne kultura množit, přičemž se chová povětšinou dle vypočítaných parametrů. Univerzálním popisem růstu kultur při vsádkové kultivaci je růstová křivka viz dále.

2.4.1 Růstová křivka

Růstová křivka je časová závislost množství buněk v kultuře na času. Jedná se o model pro vsádkové uspořádání, kde jsou všechny komponenty (substráty, buňky a inhibitory) zároveň. Při zaočkování buněk z inokulačního média do produkčního média, dochází k adaptaci metabolismu buněk na nový substrát. Tato fáze se nazývá lag-fáze. Při lag-fázi nedochází k množení buněk, nastává syntéza indukibilních enzymů a buňky nabývají na objemu. Délka lag-fáze se

odvíjí od typu použitého mikroorganismu a složení média. Po lag-fázi nastává fáze zrychlujícího se růstu, při němž se kultura adaptovala na nové médium a pomalu se začíná množit. Následuje exponenciální fáze, při níž mají buňky nejkratší generační dobu a produkují se primární metabolity. Tato fáze je nejvhodnější pro zaočkování buněk do nového média stejného typu, pro zrychlení procesu (vynechání lag-fáze). Při snižování množství živin v médiu dochází k postupnému zpomalování růstu kultury, které vyústí ve stacionární fázi. Rychlost rozmnožování buněk ve stacionární fázi se rovná rychlosti odumírání. Tvoří se sekundární metabolity a sporulující mikroorganismy sporulují. Po stacionární fázi dochází k fázi odumírání, při níž kultura spotřebovala veškeré živiny a postupně odumírá. Schéma růstové křivky se nachází na Obrázku 14 [16] [38].



Obrázek 14: Schéma růstové křivky.

2.4.2 Kultivace kvasinek

Kultivace kvasinek v laboratorních podmínkách probíhá v uměle vytvořených médiích, které se snaží přiblížit ideálním podmínkám pro růst kultury. Ideálních podmínek se dosahuje dostatečným množstvím živin v podobě organického uhlíku (převážně ve formě cukrů, organických kyselin či lipidů), dusíku (v podobě močoviny či amoniakálních solí), fosforu (ve formě fosfátů) a síry (ve formě síranů). Důležitými faktory pro kultivaci jsou dále sterilita prostředí, teplota, míchání, pH a pO_2 .

Pro správnou propagaci buněk ze zásobních kultur do produkčních medií či do bioreaktoru je nutné užít několikasupňovou inokulaci, při níž dochází k zaočkování agarových ploten a z nich kapalných inokulačních medií, jimiž se očkují produkční média. Všechny očkovací kroky musí probíhat sterilně, aby nedošlo ke kontaminaci kultur.

2.4.3 Bioreaktor (fermentor)

Bioreaktor je technologické zařízení sloužící k biotechnologické produkci metabolitů pomocí enzymů či buněk. Jedná se o nádobu z inertního materiálu, neinteragujícího s obsahem, nejčastěji jde o nerez či sklo. Vnitřní obsah a vybavení bioreaktoru musí být schopny vydržet sterilizační teplotu (121 °C). Vybavení bioreaktoru je řízeno centrálním plně automatickým systémem, který zajišťuje v průběhu chodu potřebné podmínky pro růst biomasy. Vybavením jsou

míněny chladič, topné těleso, míchadla, aerátor a čerpadla. Aby bioreaktor fungoval správně, musí obsahovat řadu čidel, mezi něž patří pH sonda, teploměr a kyslíková sonda. Na základě signálu ze sond je centrální systém schopný v čase řídit a usměrňovat parametry ve fermentoru, na základě předem určených podmínek [38].

Fermentory se dělí na několik druhů podle velikosti a podle způsobu provozu. Podle velikosti se fermentory dělí na laboratorní, čtvrtprovozní, poloprovozní a provozní. Konkrétnější parametry jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4: Rozdělení bioreaktorů podle velikosti.

Typ bioreaktoru	Objem bioreaktoru (l)
Laboratorní	do 30
Čtvrtprovozní	30 až 100
Poloprovozní	100 až 5000
Provozní	5000 a více

Podle způsobu provozu se bioreaktory dělí na vsádkové, přítokované a kontinuální. Nejpožívanější pro malobjemové bioreaktory je vsádkové (batch) uspořádání, u kterého dochází ke změnám v médiu v průběhu času, neboť se jedná o uzavřený systém. Druhým provedením je přítokované (fed-batch) uspořádání, při kterém se do vsádky v průběhu kultivace řízeně dávkuje složky media, tak aby nedocházelo k inhibici substrátem či produktem. Jedná se o hojně využívané provedení kultivace ve fermentoru. Dalším provedením je kontinuální uspořádání, které slouží převážně pro práci s imobilizovanými enzymy a biomasou. V principu jde o otevřený systém, kdy je obsah bioreaktoru doplňován čerstvým médiem za kontinuálního odvodu média s obsahem metabolitů [38], [39].

2.5 Analytické metody

Jedná se o metody stanovující kvalitu a kvantitu složek ve vzorku. V rámci analytických metod je věnována hlavní pozornost chromatografickým metodám, jelikož metabolity, konkrétně karotenoidy, ergosterol a ubiquinon, lze separovat a analyzovat z předem upraveného vzorku pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s gradientovou elucí. Analýza mastných kyselin je možná po transesterifikaci na plynovém chromatografu [40].

2.5.1 Chromatografie

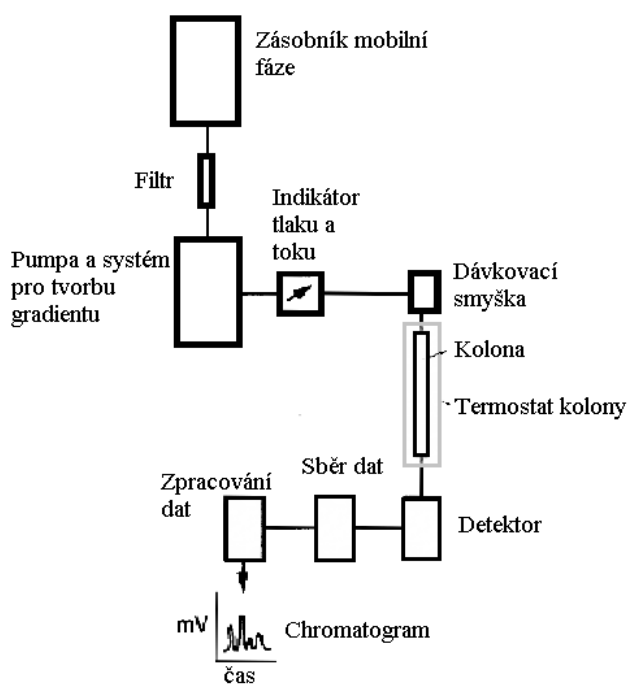
Je analytická kvantitativní i kvalitativní metoda, při níž dochází k separaci složek analytu na jednotlivé frakce. Separující komponenty se distribují mezi dvě nemísitelné fáze, mobilní a stacionární. Mobilní fáze unáší analyt přes systém stacionární fáze, kde zároveň dochází k interakci analytu s fázemi. K separaci dochází na základě rozdílné afinity složek analytu k oběma fázím [40].

2.5.2 HPLC (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je kolonová separační metoda, kde je kolona naplněna stacionární fází (pevnou látkou či kapalinou na pevné látce ukotvenou), skrze kterou protéká mobilní fáze v podobě kapaliny za vysokého tlaku. Schopnost účinné separace závisí na vhodném zvolení délky a náplně kolony, kde náplň kolony slouží jako sorbent, na němž se v průběhu procesu zadržují části analytu.

Dalším důležitým faktorem, který značně ovlivňuje efektivitu separace, je složení mobilní fáze. Metoda využívající v čase proměnlivé složení mobilní fáze se nazývá gradientová eluce, která spočívá ve změnách poměru rozpouštědel pumpovaných na kolonu v průběhu separace. Opakem je izokratická eluce, při níž se poměr mobilní fáze v průběhu času nemění.

Při výstupu z kolony pokračuje eluát na detektor, jenž je spojen s programem analýzy dat, převádějícím signál z detektoru na chromatogram, který ukazuje změny na detektoru v průběhu času. Schéma HPLC chromatografu je vyobrazeno na Obrázku 15 [41], [42], [43].



Obrázek 15: Schéma HPLC [41].

2.5.3 GC (plynová chromatografie)

Plynová chromatografie slouží k separaci látek o nízkých bodech varu. Je podobně jako HPLC v kolonovém uspořádání, kde separační kolony obsahují stacionární fázi, která může nabývat podoby adsorbentu (pevné stacionární fáze) nebo kapaliny (kapalné stacionární fáze) distribuované v tenké vrstvě po vnitřním povrchu kolony.

Mobilní fází je nosný plyn, inertní vůči interakcím s analytem. Nejlepší separace lze dosáhnout pomocí helia, avšak kvůli vysoké ceně se často využívají levnější alternativy s horšími separačními vlastnostmi, jako je vodík či dusík. Po průchodu kolonou přechází analyt na

detektor identifikující jeho separované složky. Detektor je spojený s analyzačním programem, který na základě změn signálu detektoru utváří chromatogram [41], [42], [43].

2.5.4 Absorpční UV-VIS spektrofotometrie

Jedná se o metodu detekce absorbance záření v souvislém rozsahu vlnových délek po průchodu průsvitným vzorkem v měrné cele. V případě měření v UV oblasti je nutné použít měrnou celu z UV transparentních materiálů, jako je například křemen. Pro analýzu absorbance v hladině viditelného světla lze použít měrnou celu ze skla. Zdroje záření pro viditelnou část spektra jsou wolframové a halogenové žárovky, a pro ultrafialovou část spektra se jedná o deuteriové výbojky.

Měření absorbance spočívá v prozáření vzorku monochromatickým zářením, přičemž dochází k excitaci elektronů molekulových orbitalů analytu po absorpci světla o specifických vlnových délkách. Záření, ochuzené o intenzitu ve specifických vlnových délkách, dopadá na detektor, který porovnává intenzitu záření procházejícího vzorkem s intenzitou záření procházejícím čistým rozpouštědlem bez analytu. Podle specifických absorpčních spekter lze následně identifikovat neznámé složky v analytu a na základě kalibračních závislostí lze určit i jejich kvantitu [41], [42], [43].

3 Cíl práce

Cílem práce je optimalizace kultivace kvasinek karotenogenních rodů na odpadních substrátech ve fermentoru za současného sledování metabolických změn v průběhu růstu kultury. Neméně důležitým cílem je vyvození závěrů pro praktickou aplikaci na základě získaných dat. Dosažení cílů je řešeno jednotlivými dílčími kroky:

- Literární rešerše týkající se odpadních substrátů, karotenogenních kvasinek a jejich produktů.
- Příprava směsných substrátů a kultivace vybraných kmenů kvasinek
- Průběžné sledování změn produkce metabolitů na odpadních substrátech - syrovátka, lipidy, lignocelulóza
- Řízená kultivace na vybraných médiích v laboratorním fermentoru.

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie pro kultivaci kvasinek

Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)

D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner s r.o. (ČR)

Síran amonný p.a., Lachema (ČR)

Glycerol, Lach-Ner (ČR)

Bakteriologický pepton, Himedia (India)

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

Síran horečnatý heptahydrát p.a., Chemapol (ČR)

Hydroxid draselný p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Kyselina sírová p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Odpadní tuk (Norsko)

Syrovátka (ČR)

4.1.2 Chemikálie pro extrakce a analýzy metabolitů na HPLC a GC

Methanol p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

Chloroform p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

Kyselina sírová p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Ethylacetát pro HPLC, Sigma- Aldrich (SRN)

Hexan pro HPLC, Sigma- Aldrich (SRN)

Methanol pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)

Acetonitril pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)

Chloroform pro HPLC, Sigma- Aldrich (SRN)

Ethylacetát pro HPLC, Sigma- Aldrich (SRN)

4.1.3 Chemikálie pro zpracování odpadních substrátů

Hexan p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

2-Propanol p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

4.2 Použité přístroje a pomůcky

4.2.1 Přístroje užívané pro kultivaci buněk

Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)

GKB Color Digital CCD kamera (Tchajwan)

Lucia Image active 5.0, Laboratory Imaging spol. s r.o. (ČR)

Třepačka Yellow line, (SRN)

Centrifuga Sigma Laborzentrifugen (SRN)

Analytické váhy Boeco (SRN)

Box Aura mini BioTech (ČR)

Fermentor RALF3,7, Biotech (CH)

4.2.2 Přístroje a pomůcky užívané pro izolaci a analýzu metabolitů

Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer (USA)

Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)

HPLC filtry, PRE-CUT, Alltech (GB)

HPLC/PDA sestava:

- Sestava HPLC (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Dionex ultimate series 3000 pump
- Dionex ultimate series 3000 autosampler
- Thermo fisher Vanquish detector
- Kolona kinetex EVO c18 150x4.6x2.6
- Vyhodnocovací systém Chromeleon

Termoblok – SBH 130, Stuart (GBR)

TRACE GC/FID (Thermo Fischer Scientific, USA)

- Kapilární kolona Zebron ZB-FAME, 30 m délka

HPLC/RI sestava:

- Dionex UltiMate 3000 series
- DAD detector UltiMate
- Pump UltiMate
- Column Oven LCO 101, ECOM
- ERC RefractoMax 520

4.2.3 Přístroje užívané ke zpracování odpadních substrátů

Standardní laboratorní sklo

Míchačka Benchmark Magnetic Stirrer

pH metr

Topné hnízdo

4.3 Materiál

4.3.1 Kmeny

V práci byly použity následující kultury kvasinek:

Rhodotorula kratochvilae CCY 20-2-26

Rhodosporidium toruloides CCY 062-002-001

Cystofilobasidium macerans CCY 10-1-2

Sporidiobolus pararoseus CCY 19-9-6

Rhodotorula mucilaginosa CCY 19-4-6

Všechny kultury byly získány ze Sbírký kultur kvasinek (Culture Collection of Yeasts, CCY) na Chemickém ústavu SAV v Bratislavě.

4.3.2 Odpadní substráty

Kávová sedlina – směsný odpad z tlakového přístroje na kuchyňskou přípravu kávy,

Syrovátka – Mlékárna Savencia, a.s., Příbram

Odpadní živočišný tuk – společnost Norilia, Norsko

4.4 Zpracování odpadních substrátů

4.4.1 Zpracování kávové sedliny

4.4.1.1 Sušení a extrakce

Kávová sedlina byla získána jako odpad z tlakového kávovaru na Ústavu chemie potravin a biotechnologií. Vlhká kávová sedlina byla ponechána k vysušení v horkovzdušné sušárně při teplotě 70 °C po dobu dvou dnů za občasného promíslení. Sedlina zbavená vlhkosti byla poté najemno rozemleta pomocí elektrického domácího mlýnku BOSH. Najemno namletá sedlina byla podrobena extrakci kávového oleje v Soxhletově aparatuře v extrakční směsi o složení hexan ku izopropanolu 1:1. Patrony se sedlinou zbavenou tuků byly vysušeny v sušárně.

4.4.1.2 Kyselá hydrolyza

Po extrakci a vysušení bylo odváženo 200 g kávové sedliny, jež bylo vsypáno do dvoulitrové sterilační láhve s 1 litrem 1% kyseliny sírové. Takto vytvořená směs byla důkladně promísena, vložena do autoklávu a podrobena kyselé hydrolyze při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Po zchlazení na laboratorní teplotu (21 °C) bylo v hydrolyzátu upraveno pH na hodnotu 5,5 pomocí hydroxidu draselného.

4.4.1.3 Enzymatická hydrolyza

Po úpravě pH byl kyselý hydrolyzát kvantitativně převeden do dvoulitrové kádinky vyhřívané magnetickou míchačkou s ohřevem za stálého míchání hřídelovou míchačkou (350 rpm). Po vyhřátí na 50 °C byly do směsi přidány enzymy v podobě hemiceluláz a celuláz. Takto vzniklá směs byla ponechána za stálého ohřevu a míchání k hydrolyze do viditelného rozkladu celulózy a hemicelulózy (výrazné zvýšení viskozity). Vzniklý hydrolyzát byl zfiltrován za sníženého tlaku a filtrát byl analyzován metodou HPLC/RI, na jejímž výstupu bylo možno zjistit koncentraci využitelných cukrů (glukózy, manózy, galaktózy a arabinózy). Na základě získaných dat o množství cukrů, byl hydrolyzát zahuštěn na požadovanou koncentraci pomocí vakuové odparky.

4.4.2 Zpracování syrovátky

Syrovátka byla podrobena sterilaci ve dvoulitrové sterilační lahvi v autoklávu na 15 minut při 121 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl od syrovátky odfiltrován za sníženého tlaku vysrážený syrovátkový protein. Dále byl vzniklý filtrát míchán a zahříván na magnetické míchačce s ohřevem na teplotu 37 °C. Při dosažení teploty, byla do směsi přidána laktáza v podobě komerčně dostupných tablet Laktazym od Dr. Max. Během hydrolyzy byly průběžně dělány odběry, které byly analyzovány na obsah cukrů metodou HPLC/RI. Při dosažení žádané koncentrace využitelných cukrů (glukózy a galaktózy) byl hydrolyzát opět vysterilizován v autoklávu a připraven k použití při kultivacích.

4.4.3 Zpracování odpadního živočišného tuku

Odpadní živočišný tuk byl podroben částečné bazické hydrolyze hydroxidem draselným v rámci sterilace fermentorového média (viz kapitola 4.5.3.2).

4.5 Kultivace vybraných kvasinkových kmenů

4.5.1 Inokulace

Na počátku bylo ve vysokotlakých hrncích vysterilováno YPD-agarové médium, jež bylo rozlito do sterilních Petriho misek. Na vychladlé agarové plotny bylo následně zaočkováno několik kliček ze zásobních kultur z kryozkumavek. Po optimálním namnožení buněk (2-3 dny) byly kultury na agarových plotnách připraveny k přeočkování do kapalných inokulačních YPD médií, připravených a vysterilovaných v Erlenmeyerových baňkách. Přeočkování bylo provedeno v poměru 1 klička kultury na 10 ml média. Složení YPD inokulačních médií je uvedeno v Tabulce 5.

Tabulka 5: Složení YPD médií.

Typ média		Složky	Množství
YPD agarové médium	YPD kapalné médium	Agar	15 g
		Glukóza	20 g
		Bakteriologický pepton	10 g
		Kvasničný autolyzát	20 g
		Destilovaná voda	1000 ml

4.5.1.1 Metoda dvojí inokulace

V rámci screeningových fermentorových kultivací bylo postupováno metodou dvojí inokulace. U screeningových kultivací bylo první inokulační médium (I_1) užito v množství 50 ml a druhé inokulační médium (I_2) v množství 125 ml se zaočkováním 25 ml z I_1 do I_2 . Vždy bylo dodrženo pravidlo inokulačního poměru 1:5. Produkční média o objemu 50 ml byla zaočkována 10 ml inokulačního média.

4.5.1.2 Metoda jednoduché inokulace

V případě fermentoru bylo užito jednoho inokula o objemu 300 ml v 1000ml Erlenmeyerově baňce. Zaočkování bylo uskutečněno ve sterilním boxu sedmi kličkami kvasinkové kultury z Petriho misek. Takto vzniklé inokulum bylo ponecháno ke kultivaci za laboratorní teploty, stálého osvětlení a třepání na laboratorní třepačce po dobu 48 h. Narostlé inokulum bylo sterilně v boxu převedeno do předem vysterilované 500ml sterilační láhve s probublávacím víčkem. Inokulum bylo do fermentoru dopraveno přes systém hadiček, kde hnací silou pro tok inokula byl tlak sterilního vzduchu.

Pozn.: Před zaočkováním do produkčních médií, byla u inokul vždy provedena kontrola na mikrobiální kontaminaci pomocí světelného mikroskopu.

4.5.2 Baňkové kultivace

Screening byl proveden v 250ml Erlenmeyerových baňkách s finálním objemem kultivačního média 60 ml po zaočkování. Média obsahovala stejný anorganický základ (viz Tabulka 6) a lišila se v množství a formě uhlíkatého substrátu (viz Tabulka 7). Kvasinky byly po zaočkování do produkčních médií kultivovány za laboratorní teploty, neustálého osvětlení a za stálého třepání na laboratorních třepáčkách. Po 96 h byly kultivace terminovány a byly odebrány vzorky pro zpracování na analýzu.

Tabulka 6: Anorganická součást všech produkčních médií.

Složky	Množství
(NH ₄)SO ₄	4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,696 g
KH ₂ PO ₄	4 g
Voda (vodovodní)	1000 ml

Tabulka 7: Množství uhlíkatého substrátu v produkčních médiích na 1000 ml vody, kde jednotlivé sloupce popisují množství uhlíkatého substrátu v poměru k množství dusíku v médiu, jinak zvaný C/N poměr.

	C/N 13	C/N 25	C/N 50	C/N 100
glukóza (g)	23,63	45,44	90,89	181,77
glycerol (g)	24,16	46,46	92,92	185,84

4.5.3 Fermentor

4.5.3.1 Podmínky

Kultivace byla uskutečněna ve 2,5l laboratorním fermentoru, naplněném 1,5 l produkčního média (1,8 l po zaočkování). Před kultivací bylo vždy nutné fermentor s médiem vysterilovat v autoklávu, při teplotě 121 °C po dobu 15 minut, poté vytemperovat na teplotu 22 °C (chladičem, či elektrickým ohříváčem), ustálit pH na hodnotu 5,8 (pomocí peristaltických čerpadel napojených na zásobníky 20% hydroxidu sodného a kyseliny sírové) a nakalibrovat kyslíkovou elektrodu. V průběhu kultivace byly vnitřní podmínky ve fermentoru řízeny operačním systémem tak, aby bylo dosaženo podmínek pO₂ v rozmezí 20-30 %, pH okolo hodnoty 5,8 a teploty 22 °C. Aby nedocházelo k destrukci buněk vlivem stříhových sil, bylo nastaveno maximální omezení míchání na 1000 ot/min. Veškeré látky vstupující do média byly předem vysterilovány, vzduch pomocí filtrace a kyselina s hydroxidem tepelnou sterilací.

4.5.3.2 Příprava produkčního média

Při přípravě produkčních medií se směsí syrovátkového hydrolyzátu či hydrolyzátu kávové sedliny (dále jen kávový hydrolyzát) a odpadního tuku se postupovalo následovně. Na základě měření na sestavě HPLC/RI bylo určeno množství rozpuštěných cukrů v hydrolyzátu. Dle množství rozpuštěných cukrů bylo odměřeno přesné množství hydrolyzátu, které bylo přidáno k anorganickému základu fermentorového média (viz Tabulka 8). Následně, dle požadovaného C/N poměru, byl do média odvážen odpadní tuk (viz Tabulka 9). Poměr množství uhlíku mezi oběma substráty (hydrolyzátem a tukem) byl vždy 1:1. Aby došlo v průběhu sterilace k částečné bazické hydrolýze tuku, byl do média přidáván hydroxid draselný v desetinovém poměru k hmotnosti tuku. Anorganický a organický základ média byl doplněn vodou na objem 1,5 l a připraven ke sterilaci.

Pozn: Obsah uhlíku v tuku byl stanoven na základě studie: Study of Metabolic Adaptation of Red Yeasts to Waste Animal Fat Substrate, viz seznam literatury [44].

Tabulka 8: Složení anorganického základu pro 1,5 l fermentorového produkčního média.

Složky	Množství
Močovina	2,715 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,044 g
KH ₂ PO ₄	6 g

Tabulka 9: Navážky tuku a KOH v produkčních fermentorových médiích za daných C/N poměrů.

	C/N 13	C/N 25	C/N 50
Tuk (g)	9,1	17,5	35
KOH (g)	0,91	1,75	3,5

4.5.3.3 Kultivace a odběry

Samotná kultivace trvala 48 h za průběžných odběrů vzorků pro analýzu. Při odběrech bylo z fermentoru odpouštěno 45 ml média, 5 ml na průplach odběrového zařízení a 40 ml pro analýzu. Vzorky byly odebírány do 50ml plastových zkumavek, ve kterých se buď ihned zpracovaly, nebo uskladnily v mrazničce. Vzorky byly odebírány ve třech základních časových intervalech 0 h, 22-25 h a 48 h. Dále byly vzorky odebírány v různých časech s minimálním rozestupem 1,5 h mezi odběry (způsobeno rozdílnou časovou dostupností obsluhy fermentoru).

4.6 Zpracování a analýza vzorků

4.6.1 Zpracování vzorku po odběru

4.6.1.1 Gravimetrické stanovení biomasy

Odebrané vzorky byly důkladně protřepány na vortexu a následně z nich byl pipetou odebrán 1 ml média do předem zvážené (na analytických vahách) 2ml plastové zkumavky. Zkumavky s takto odebranými vzorky byly odstředěny (10 000 ot/min; 3 min), supernatant byl odlit, obsah byl promyt 1 ml destilované vody, rozsuspendován a odstředěn. Promývací procedura byla případně opakována, dokud nebyl supernatant po promytí čirý a bezbarvý. Zkumavka s buněčným sedimentem byla ponechána na 20 minut v hlubokomrazicím boxu (o teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Zkumavky se zmraženým obsahem byly vloženy do lyofilizátoru a lyofilizovány do kompletního vysušení biomasy (cca 2 dny). Zkumavky s vysušeným obsahem byly zváženy na analytických vahách a z rozdílů hmotností byla určena koncentrace biomasy v médiu.

4.6.1.2 Zpracování vzorku

Vzorek byl po odběru ke gravimetrickému zpracování odstředěn (7000 ot/min; 3 min), ze supernatantu byly odebrány cca 2 ml k analýze zbytkových cukrů a glycerolu na sestavě HPLC/RI. Zbytek supernatantu byl vylit a sediment byl rozsuspendován ve 20 ml destilované vody. Vzorek byl opět odstředěn a supernatant byl vylit. Promývací procedura byla opakována, dokud nebyl supernatant po promytí čirý a bezbarvý. Biomasa byla následně převedena do 2ml plastové zkumavky, zmrazena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a zlyofilizována. Zlyofilizovaná biomasa byla uskladněna v mrazničce.

4.6.2 Analýza sacharidů metodou HPLC/RI

Vzorky se zbytkovým cukrem či glycerolem byly dvakrát naředěny a přefiltrovány přes nylonový filtr. Takto připravené vzorky byly o objemu 20 μl dávkovány na HPLC sestavu Dionex Ultimate 3000 od firmy Thermo Fischer Scientific s RI detektorem. Vzorek byl analyzován na koloně Rezex ROA Organic acids s rozměry 300x7,8 mm při teplotě $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min a době analýzy 10 minut. Mobilní fáze byla složena z 0,005 M kyseliny sírové rozpuštěné v MiliQ vodě.

4.6.3 Extrakce karotenoidů pro HPLC

Karotenoidy, ergosterol a ubichinon byly extrahovány zároveň v jednom vzorku pomocí extrakce dle Folche. Nejprve se na analytických vahách odvážíla biomasa v rozmezí množství 5-17 mg do šroubovacích plastových vialek o objemu 2 ml. Biomasa ve vialkách byla hydratována 1 ml destilované vody po dobu 30 minut. Poté byla biomasa zcentrifugována a supernatant byl vylit. K hydratované biomase bylo následně přidáno cca 0,5 ml skleněných kuliček a 1 ml methanolu. Vialky se směsí byly intenzivně protřepány na multipozičním vortexu po dobu 20 minut. Následovalo přelití celého obsahu vialky do 15 ml zkumavky se závitkem, do níž byly napipetovány 2 ml chloroformu. Vzniklá směs byla opět 20 minut třepána na vortexu. Po protřepání následovalo přidání 1 ml destilované vody a centrifugace vzorku (1500 ot/min, 1 min). Po rozdělení směsi na dvě, byla pomocí pipety odebrána do 15 ml zkumavky spodní chloroformová fáze. Chloroform byl odpařen na termobloku vyhřátém na $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ stlačeným dusíkem.

Odparek byl rozpuštěn ve 2 ml směsi HPLC rozpouštědel o složení acetonitril ku ethylacetátu 2:1. Směs rozpouštědel byla s odparkem důkladně protřepána na vortexu a přefiltrována přes PTFE filtr do skleněné vialky pro HPLC/GC. Takto připravený vzorek byl buď uskladněn v mrazničce či ihned zanalyzován.

4.6.4 Analýza karotenoidů metodou HPLC/PDA

Vzorky s obsahem karotenoidů, ergosterolu a ubiquinonu byly podrobeny analýze na HPLC značky Thermo Fischer Scientific, na koloně kinetex EVO C18 o rozměrech 150x4,6x2,6 mm. Eluce probíhala v gradientovém módu o průtoku mobilní fáze 1,2 ml/min a dobou analýzy 25 minut. Složení mobilních fází vyobrazuje Tabulka 10. Změna gradientu mobilní fáze na koloně je ukázána v Tabulce 11. Detekce probíhala na PDA detektoru při vlnových délkách 450 nm pro karotenoidy a 280 nm pro ergosterol a ubiquinon. Identifikace a kvantitativní stanovení bylo provedeno na základě předem naměřených standardů a jejich kalibračních křivek. Vyhodnocení pak probíhalo v programu Chromeleon.

Tabulka 10: Složení mobilních fází.

Mobilní fáze	složka	% (obj)
A	Methanol	2
	Acetonitril	84
	100 mM trisHCl pufr o pH 8	14
B	Methanol	60
	Ethylacetát	40

Tabulka 11: Schéma gradientové eluce analýzy karotenoidů.

Čas analýzy [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	100	0
13	0	100
19	0	100
20	100	0
25	100	0

4.6.5 Transesterifikace a extrakce mastných kyselin pro GC analýzu

Do krimpovacích vialek byla na analytických vahách navážena lyofilizovaná biomasa v rozmezí hmotností 5-17 mg. Dále bylo do krimpovací vialky napipetováno 1,8 ml transesterifikační směsi s obsahem interního standardu C:17 o koncentraci 0,5 mg/ml rozpuštěného v 15 % kyselině sírové v HPLC methanolu. Takto vzniklá směs byla zakrmpována a ponechána k transesterifikaci v termobloku při teplotě 85 °C na 2 hodiny. Následně po vychladnutí směsi byl celý obsah krimpovací vialky převeden do 4ml vialky s 0,5 ml 0,05 M roztoku NaOH. Ke směsi

se dále připipetoval 1 ml HPLC hexanu. Vzniklá směs byla 5 minut intenzivně třepána na vortexu. Po oddělení fází bylo z vialky odebráno 100 μ l vrchní hexanové fáze do skleněné vialky pro HPLC/GC s předem napipetovanými 900 μ l HPLC hexanu. Takto vzniklé vzorky byly připraveny pro analýzu na GC.

4.6.6 Analýza mastných kyselin metodou GC/FID

Vzorky s methylestery mastných kyselin byly podrobeny analýze na plynovém chromatografu Thermo Scientific TRACETM Gas Chromatograph, vybaveném autosamplerem Thermo Scientific AI 1310, automatickým dávkovačem se splitterem, kolonou Zebron ZB-FAME o rozměrech 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m a plamenově ionizačním detektorem (FID). Analýza byla provedena za těchto podmínek:

- Mobilní fáze (nosný plyn) – vodík o stálém průtoku 1 ml/min
- Objem nástřiku vzorku 1 μ l
- Teplota injektoru 250 °C, poměr děliče toku 10
- Teplota na detektoru 260 °C s průtoky plynů 350 ml/min u vzduchu, 35 ml/min u vodíku a 30 ml/min u dusíku
- Teplotní program: 80 °C udržováno 1 minutu ($t_R=1$ min), poté zvýšení teploty na 140 °C s gradientem 15 °C/min ($t_R=5$ min), následované dalším zvýšením na 190 °C s gradientem 3 °C/min ($t_R=21,7$ min), dále zvýšení na teplotu 260 °C s teplotním gradientem 25 °C/min a udržení teploty po dobu 1 minuty ($t_R=25,5$ min); celková doba analýzy 25,5 minut

5 Výsledky a diskuze

5.1 Stanovení růstových a produkčních vlastností kultur

Před aplikací mikroorganismů do průmyslu je nutné provést řadu testů, které simulují podmínky v provozních rozměrech. Mezi takové simulace patří základní screening prováděný v baňkových kultivacích. Na základě analýzy dat ze screeningu se volí druh mikroorganismu a kultivační podmínky, jako je složení media, pH, teplota či aerace tak, aby bylo dosaženo nejlepších produkčních vlastností kultury v průběhu kultivace. Pro simulaci provozních podmínek se využívá laboratorní fermentor s řízeným prostředím.

Hlavním úkolem této práce byla kultivace karotenogenních kvasinek na odpadních substrátech ve fermentoru. Cílem kultivace bylo simulovat průmyslově-provozní podmínky a analyzovat metabolity produkované karotenogenními kvasinkami. Data získaná po analýze odebraných vzorků na sestavách HPLC/DAD a GC/FID, udávala komplexní informace o složení lipidové frakce buněk, konkrétně o množství a složení mastných kyselin, karotenoidů, ergosterolu či koenzymu Q. V kombinaci takto získaných dat s gravimetrickou analýzou, bylo možné určit koncentrace všech sledovaných metabolitů v médiu v čase odběru.

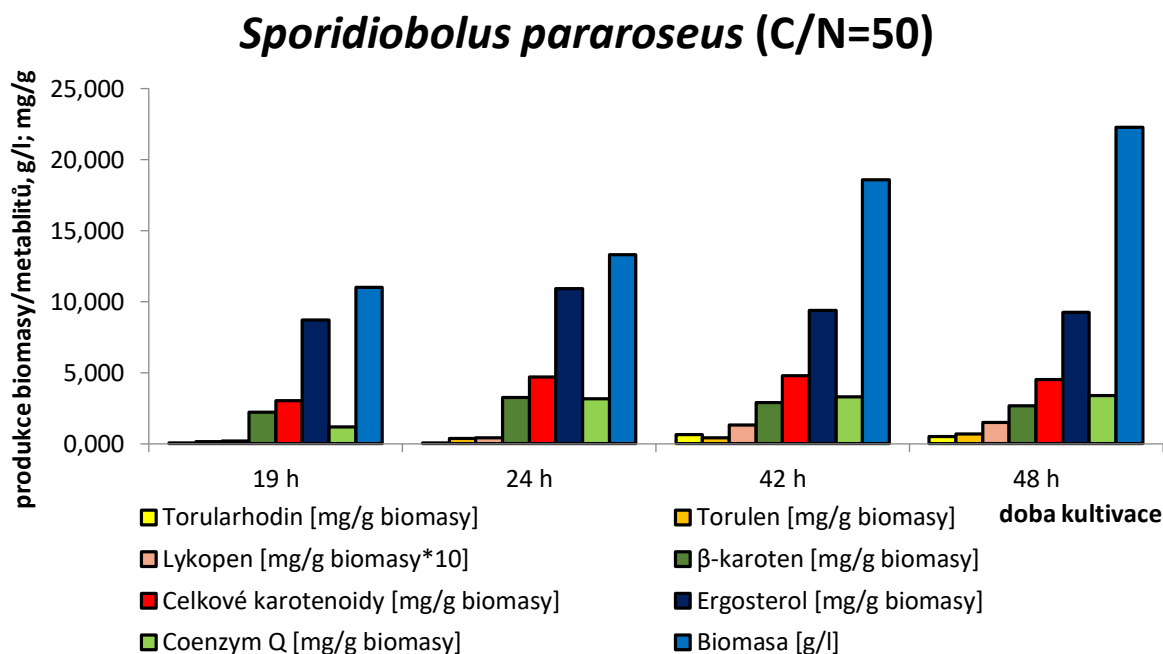
Výsledky provedených analýz jsou uvedeny v Grafu 1 až Grafu 33. Z nich lze vyvozovat níže komentující srovnání (grafy 34-39) a závěry.

5.1.1 Fermentorové kultivace na směsi tuku a syrovátkového hydrolyzátu

Kmeny byly na základě modelových baňkových kultivací kultivovány ve fermentoru v produkčních médiích o různých C/N poměrech, viz Tabulka 12. C/N poměry byly voleny na bázi nejvyšších produkcí celkových karotenoidů. Zvolené C/N poměry byly získány z předešlých diplomových prací, zabývajících se vlivem C/N poměru na produkci karotenoidů v karotenogenních kvasinkách [45].

Tabulka 12: Složení produkčních médií v závislosti na rodu kvasinky na C/N poměru.

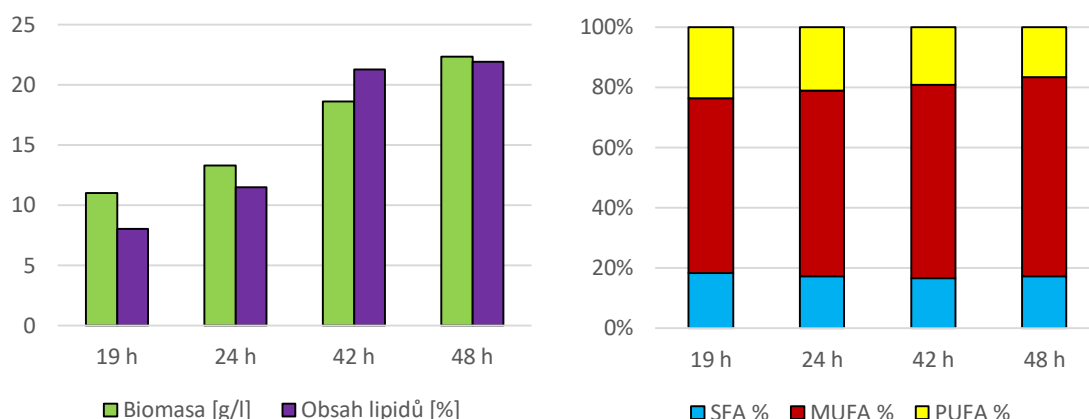
kmen	C/N poměr
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	50
<i>Rhodotorula kratochvilae</i>	50
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	25
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	13
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	25



Graf 1: Diagram závislosti průběžných produkčních vlastností biomasy na čase kmene u *Sporidiobolus pararoseus*, kultivovaného ve fermentoru na směsi odpadního živočišného tuku a syrovátkového hydrolyzátu za C/N poměru 50.

Na základě diagramu (viz Graf 1) bylo vyvozeno, že nejvyšších hodnot koncentrace biomasy nabývala kultura ve 48. hodině kultivace (22,3 g/l), navíc lze pozorovat výrazný nárůst biomasy mezi prvním a posledním odběrem. V průběhu kultivace lze pozorovat značný nárůst celkových karotenoidů, přičemž nejvyšší kumulace karotenoidů v buňkách byla pozorována ve 42. hodině kultivace (4,781 mg/g biomasy). Nejvyšší kumulace ergosterolu buňkami byla vypořovována ve 24. hodině kultivace. Ve 48. hodině byla zaznamenána nejvyšší koncentrace koenzymu Q (3,397 mg/g biomasy).

Na základě diagramů v Grafech 2-3 bylo vyvozeno, že s růstem biomasy se v průběhu kultivace zvyšovalo procento obsahu lipidů v buňkách s nejvyšší hodnotou ve 48. hodině (29,91 %). Dále docházelo k mírnému snižování obsahu polynenasycených mastných kyselin. Nejvyšší zastoupení v rámci tukové frakce dosahovaly mononenasycené (dále MUFA) mastné kyseliny, zejména kyselina olejová, a to v celém průběhu kultivace.

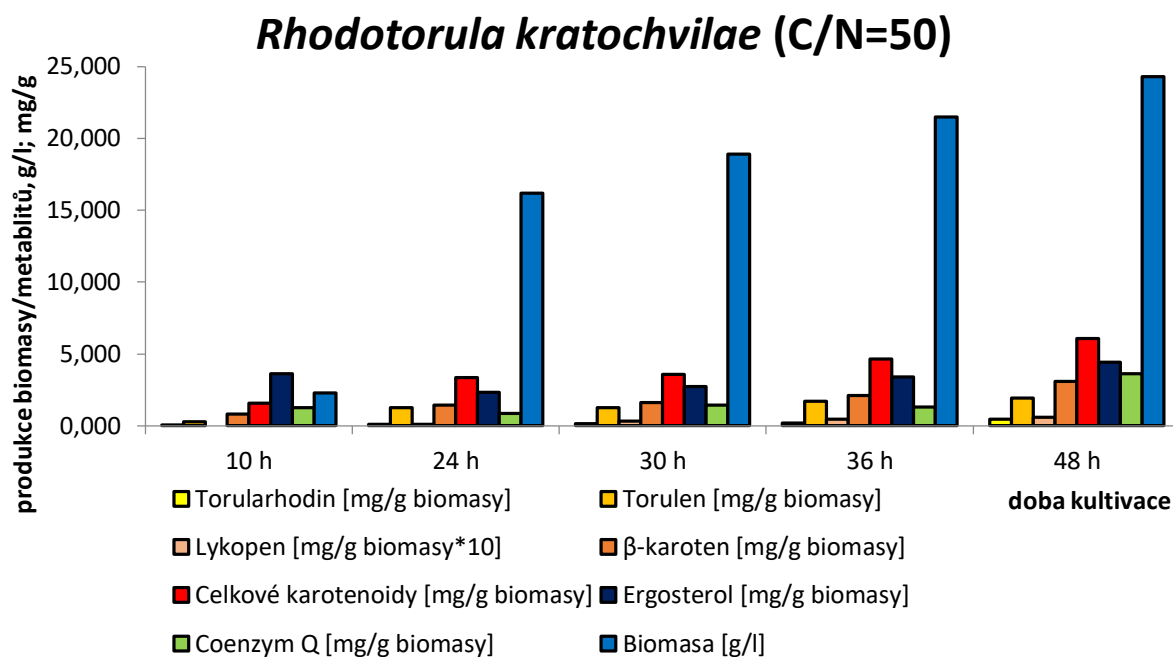


Grafy 2-3: Diagramová zobrazení koncentrace biomasy v porovnání obsahem lipidů v biomase a procentuálním rozložením mastných kyselin do tří skupin (viz kapitola seznam zkratk) při kultivaci kmene *Sporidiobolus pararoseus* na odpadním tuku a syrovátkovém hydrolyzátu.

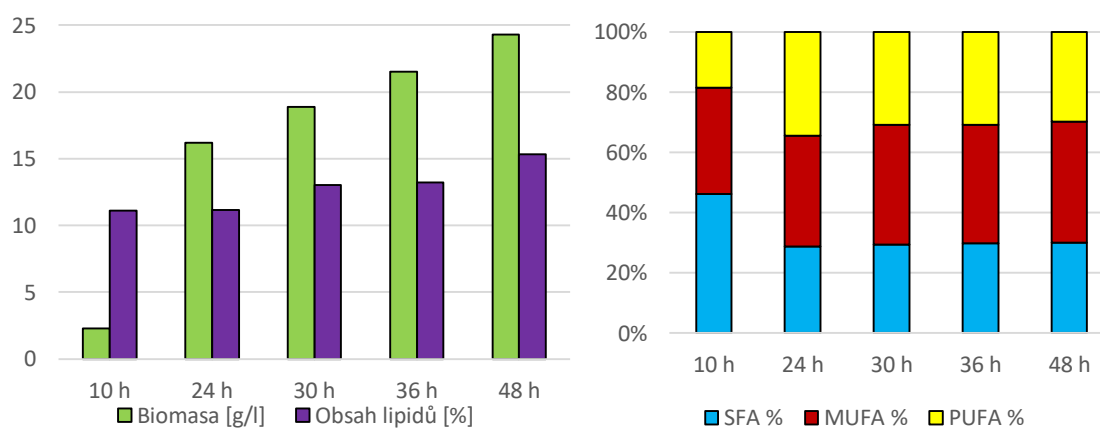
5.1.1.2 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula kratochvilae*

Na diagramu (viz Graf 4) lze vidět, že kultura kvasinek vykazovala stabilní růst až do konce kultivace v čase 48 h, kdy byla zjištěna nejvyšší koncentrace biomasy (24,3 g/l). S růstem biomasy se zvyšovala i koncentrace karotenoidů v buňkách, jež dosáhla maxima v čase 48 h (6,080 mg/g biomasy). Ergosterol od 24. hodiny vykazoval v průběžných odběrech rostoucí tendenci, přičemž nejvyšší obsah ergosterolu v buňkách byl pozorován ve 48. hodině kultivace (4,413 mg/g biomasy). Koenzym Q nevykazoval v průběhu kultivace do 36. hodiny znatelné přírůstky při vztažení k biomase. Signifikantní nárůst obsahu koenzymu Q lze pozorovat až mezi 36. hodinou a 48. hodinou, přičemž nejvyšší hodnota koncentrace byla ve 48. hodině kultivace (3,648 mg/g biomasy).

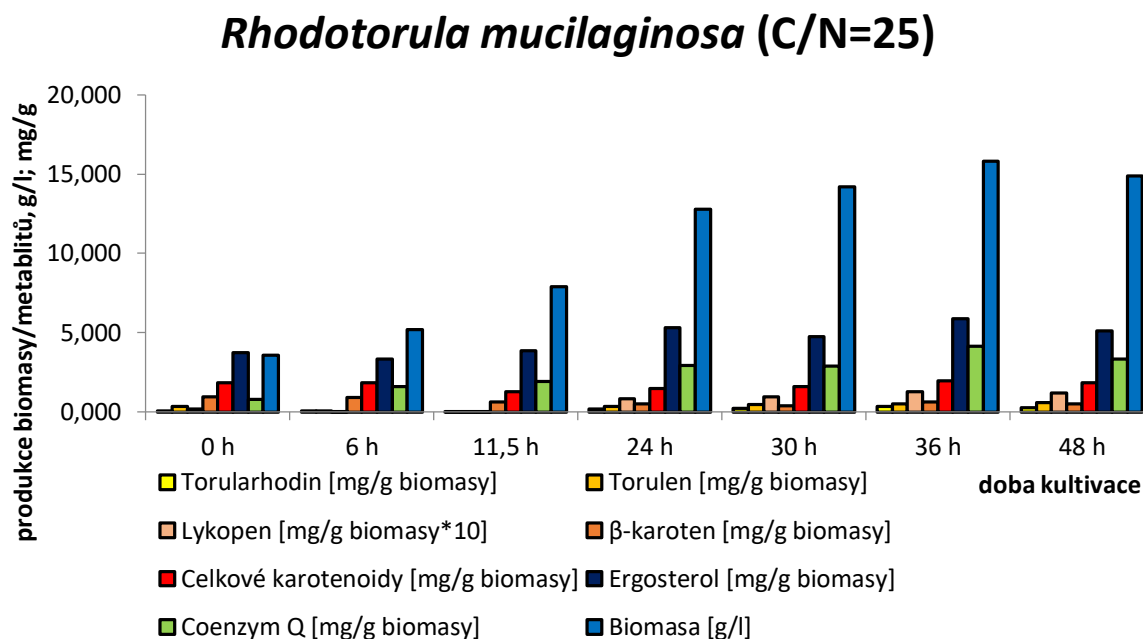
Na základě hodnot v Grafech 5-6 bylo zjištěno, že procentuální zastoupení lipidů v buněčné hmotě rostlo společně se zvyšující se koncentrací biomasy v médiu. Nejvíce mastných kyselin bylo v buněčné hmotě nakumulováno ve 48. hodině kultivace (15,33 %). Výraznější změna poměrového zastoupení mastných kyselin byla pozorována mezi 10. a 24. hodinou, při níž se snížilo množství nasycených mastných kyselin (dále SFA) a výrazněji narostlo zastoupení polynenasycených mastných kyselin (dále PUFA). Od 24. hodiny až do ukončení kultivace se poměrové zastoupení výrazně neměnilo, přičemž nejvíce byly zastoupeny MUFA.



Graf 4: Diagram závislosti průběžných produkčních vlastností biomasy na čase kmene u *Rhodotorula kratochvilae*, kultivovaného ve fermentoru na směsi odpadního živočišného tuku a syrovátkového hydrolyzátu za C/N poměru 50.



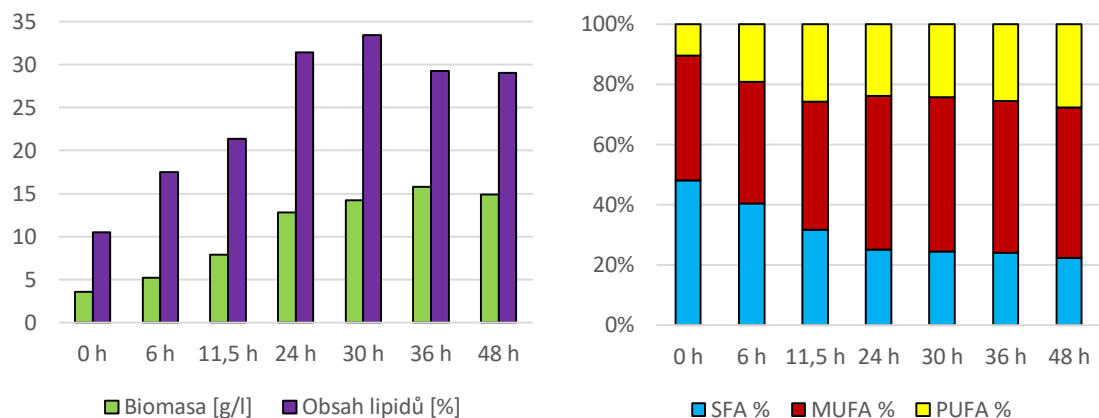
Grafy 5-6: Diagramy koncentrace biomasy v porovnání s obsahem lipidů v biomase a procentuálním rozložením mastných kyselin do tří kategorií při kultivaci kmene *Rhodotorula kratochvilae* na odpadním tuku a syrovátkovém hydrolyzátu.



Graf 7: Diagram závislosti průběžných produkčních vlastností biomasy na čase kmene u *Rhodotorula mucilaginosa*, kultivovaného ve fermentoru na směsi odpadního živočišného tuku a syrovátkového hydrolyzátu za C/N poměru 25.

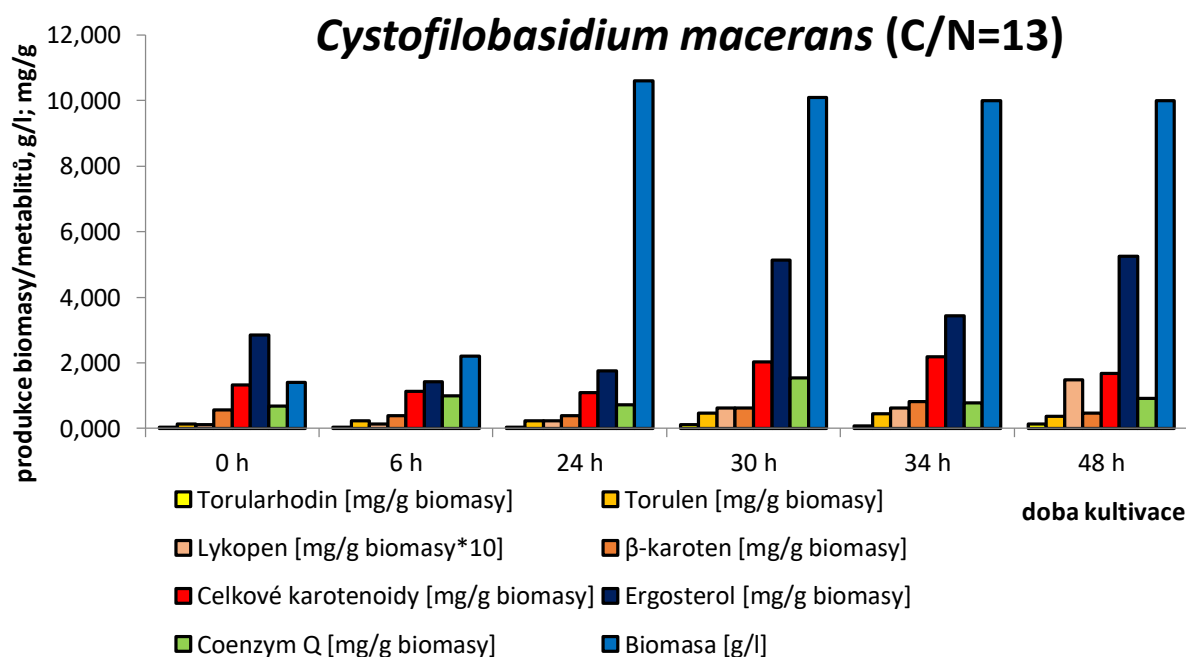
Dle získaných dat vyobrazených v Grafu 7 vykazovala koncentrace biomasy stálý přírůstek až do svého maxima v čase 36 h (15,8 g/l). Obsah karotenoidů v biomase vykazoval klesající tendenci od počátku kultivace do 11,5 hodiny. Navyšování obsahu karotenoidů bylo pozorováno až od 24. hodiny do 36. hodiny, kde množství karotenoidů dosáhlo svého maxima (1,960 mg/g biomasy). Maxima ve 36. hodině dosáhly také koenzym Q (4,137 mg/g biomasy) a ergosterol (5,887 mg/g biomasy). Pokles sledovaných hodnot mezi 36. hodinou a 48. hodinou kultivace mohl být způsoben spotřebováním využitelného uhlíkatého substrátu.

Z dat uvedených v Grafech 8-9 bylo vyvozeno, že se od počátku kultivace s růstem kultury zvyšoval procentuální obsah lipidů v biomase do 30. hodiny, kdy dosáhl svého maxima (33,44 %). Poměrové složení mastných kyselin se v průběhu kultivace měnilo. Od počátku kultivace byl pozorován značný přírůstek v poměru nenasycených mastných kyselin (dále UFA), a snižující se procentuální zastoupení SFA. Od 30. hodiny byl pozorován mírný úbytek v poměru MUFA a SFA za malého zvýšení poměru PUFA.



Grafy 8-9: Diagramy koncentrace biomasy v porovnání s obsahem lipidů v biomase a procentuálním rozložením mastných kyselin do tří kategorií při kultivaci kmene *Rhodotorula mucilaginosa* na odpadním tuku a syrovátkovém hydrolyzátu.

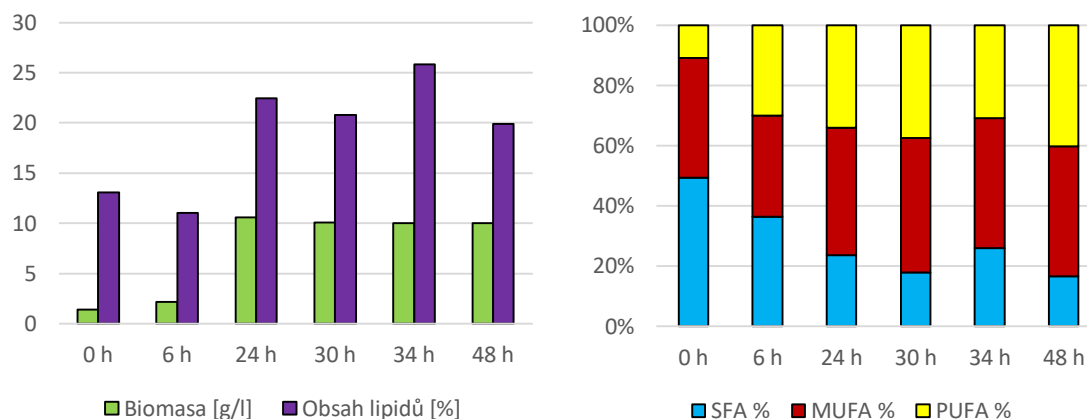
5.1.1.4 Produkční vlastnosti kmene *Cystofilobasidium macerans*



Graf 10: Diagram závislosti průběžných produkčních vlastností biomasy na čase kmene u *Cystofilobasidium macerans*, kultivovaného ve fermentoru na směsi odpadního živočišného tuku a syrovátkového hydrolyzátu za C/N poměru 13.

Z hodnot zaznamenaných v Grafu 10 byl vypořován značný nárůst biomasy mezi počátkem kultivace a 24. hodinou, kdy dosáhla koncentrace biomasy nejvyšší hodnoty (10,6 g). Poté se v průběhu kultivace koncentrace biomasy mírně snižovala do 34. hodiny a dle pozorování ve 48. hodině zůstala až do konce kultivace konstantní.

Nejvyššího množství karotenoidů biomasa naakumulovala ve 34. hodině (2,182 mg/g biomasy). Největšího obsahu ergosterolu bylo dosaženo ve 48. hodině kultivace (5,243 mg/g biomasy). Nejvyšší koncentrace koenzymu Q v sušině byla pozorována ve 30. hodině (1,540 mg/g biomasy). Konstantní koncentrace biomasy mezi posledními dvěma odběry si lze vysvětlit tím, že kultura dosáhla stádia stacionární fáze.

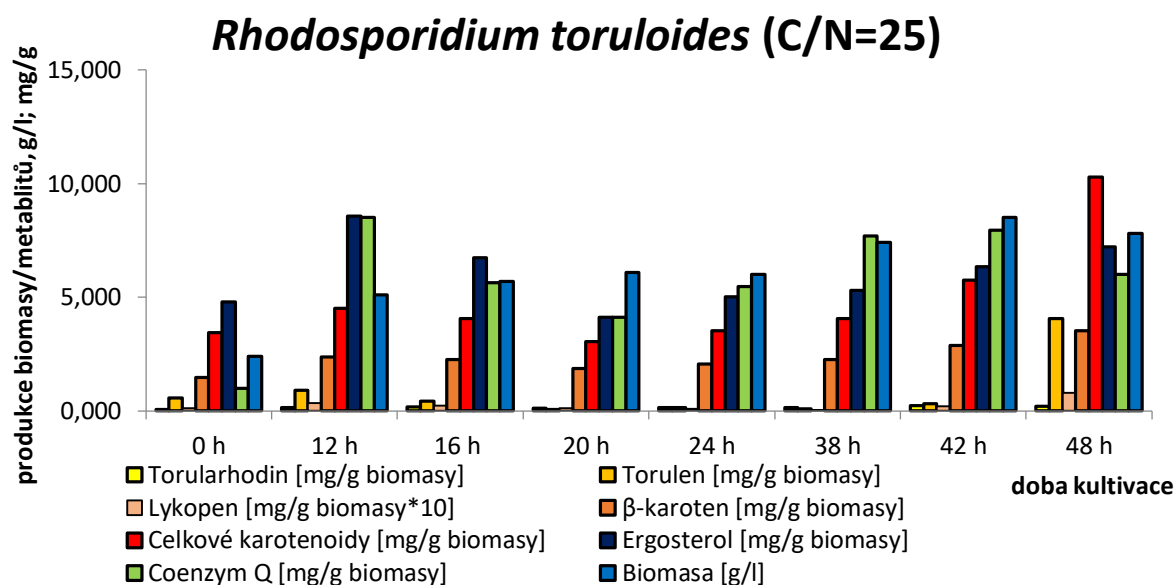


*Grafy 11-12: Diagramy koncentrace biomasy v porovnání obsahem lipidů v biomase a procentuálním rozložením mastných kyselin do tří kategorií při kultivaci kmene *Cystofilobasidium macerans* na odpadním tuku a syrovátkovém hydrolyzátu.*

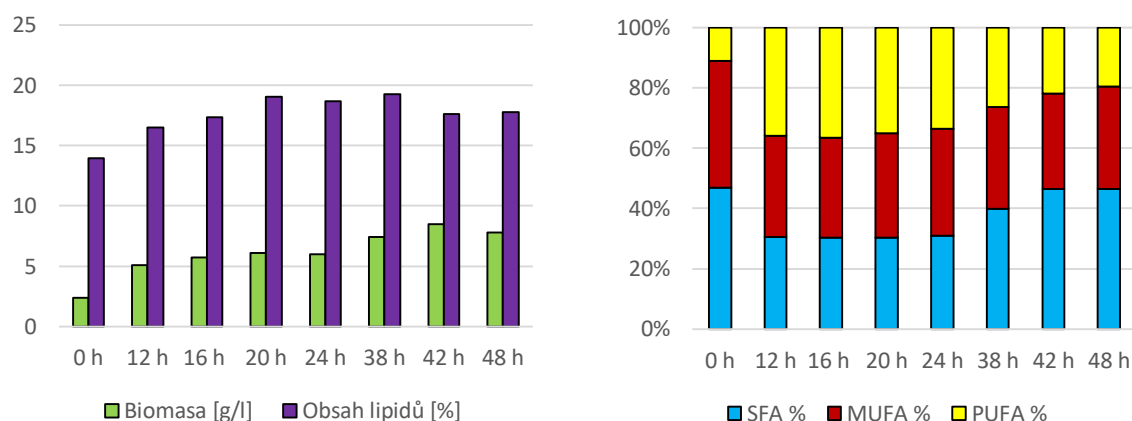
Z informací v Grafech 11-12 bylo zjištěno, že nejvyšší obsah lipidů v biomase byl ve 34. hodině (25,81 %). Poměrové zastoupení mastných kyselin bylo zpočátku kultivace velmi proměnlivé, od 0. hodiny do 24. hodiny docházelo ke zvyšování zastoupení UFA a snižování zastoupení SFA. Poté až do konce kultivace docházelo jen k mírnému kolísání hladin zastoupených typů mastných kyselin.

5.1.1.5 Produkční vlastnosti kmene *Rhodospiridium toruloides*

Na základě dat v Grafu 13 bylo zjištěno, že kvasinková biomasa postupně navyšovala svoji koncentraci do 42. hodiny, kdy dosáhla svého maxima (8,5 g/l). Koncentrace karotenoidů v biomase dosáhla v průběhu kultivace dvou maxim, prvního lokálního ve 12. hodině a druhého celkového ve 48. hodině (10,298 mg/g biomasy). Koncentrace ergosterolu (8,558 mg/g biomasy) a koenzymu Q (8,509 mg/g biomasy) v sušině dosahovaly nejvyšších hodnot po 12 hodinách kultivace



Graf 13: Diagram závislosti průběžných produkčních vlastností biomasy na čase kmene u *Rhodosporidium toruloides*, kultivovaného ve fermentoru na směsi odpadního živočišného tuku a syrovátkového hydrolyzátu za C/N poměru 25.



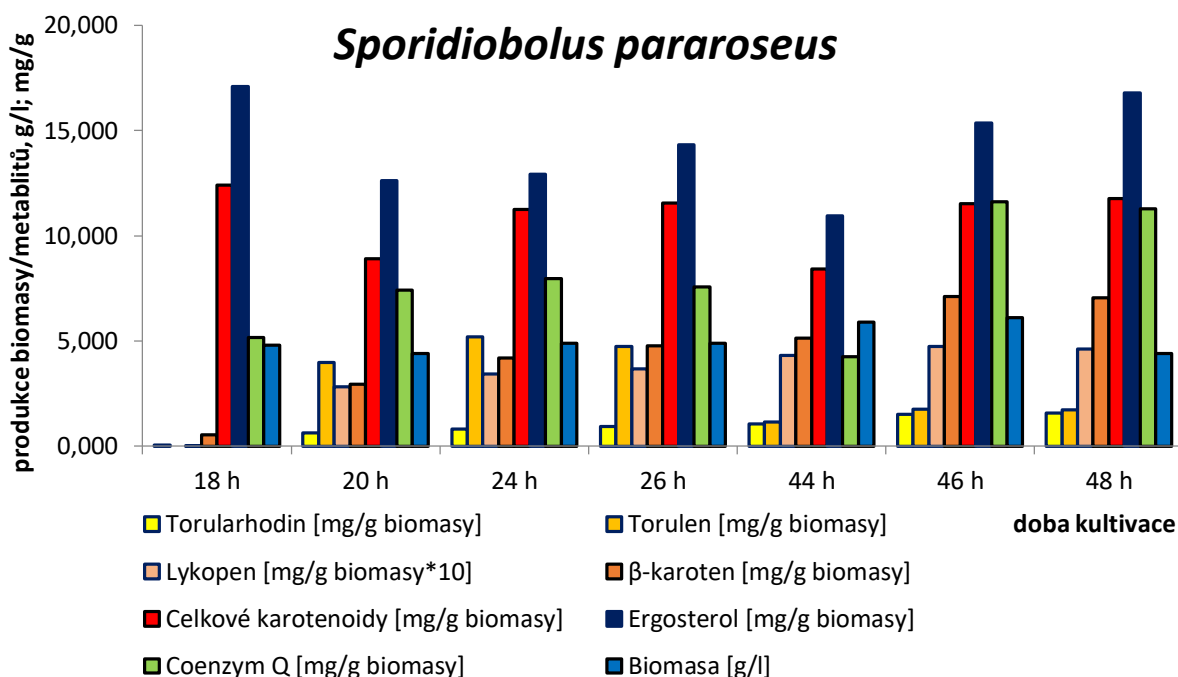
Grafy 14-15: Diagramy koncentrace biomasy v porovnání obsahem lipidů v biomase a procentuálním rozložením mastných kyselin do tří kategorií při kultivaci kmene *Rhodosporidium toruloides* na odpadním tuku a syrovátkovém hydrolyzátu.

Z dat vyobrazených v Grafech 14-15 bylo vypořováváno, že do 32. hodiny rostlo procentuální zastoupení mastných kyselin v biomase. Nejvyšší hodnoty však dosáhlo ve 38. hodině (19,24 %). Do 12. hodiny od počátku kultivace se snížilo procentuální zastoupení SFA a MUFA za současného zvýšení poměrového zastoupení PUFA. Od 24. hodiny lze pozorovat nárůst poměru SFA na úkor převážně PUFA.

5.1.2 Fermentorové kultivace na směsi tuku a kávového hydrolyzátu

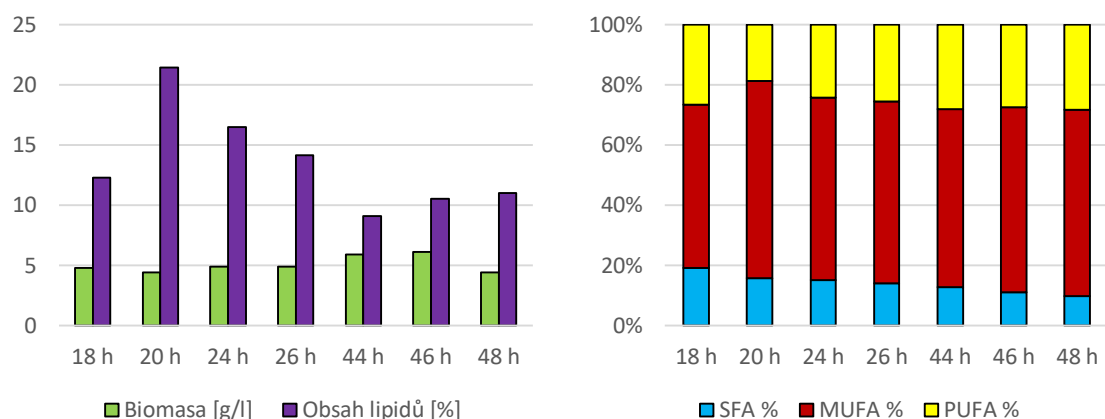
Veškeré fermentorové kultivace na směsi tuku a kávového hydrolyzátu byly provedeny na médiích o stejném C/N poměru (C/N 13), a to zejména vzhledem k velké časové náročnosti extrakce a hydrolyzy kávové sedliny. Kultivace na vyšších C/N poměrech budou provedeny v následujících pracích.

5.1.2.1 Produkční vlastnosti kmene *Sporidiobolus pararoseus*



Graf 16: Diagram závislosti průběžných produkčních vlastností biomasy na čase kmene u *Sporidiobolus pararoseus*, kultivovaného ve fermentoru na směsi odpadního živočišného tuku a kávového hydrolyzátu za C/N poměru 13.

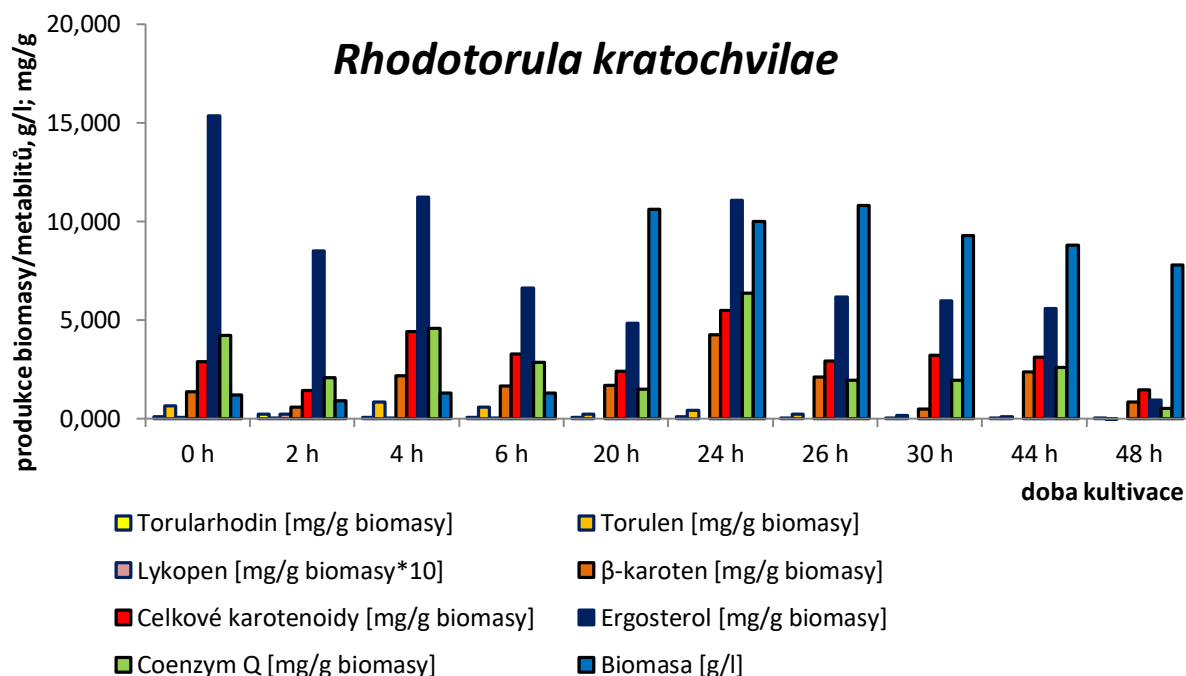
Z výsledků analýzy vložených do Grafu 16 bylo vypořováváno, že koncentrace biomasy mírně rostla od 20. do 46. hodiny, kdy dosáhla svého maxima (6,3 g/l). Zastoupení karotenoidů v biomase dosahovalo v průběhu kultivace vyšších hodnot, nejvyšší hodnota byla vypořována v 18. hodině kultivace (12,401 mg/g biomasy). Ve stejném odběru bylo zjištěno i nejvyšší zastoupení ergosterolu v biomase (17,086 mg/g biomasy). Koenzym Q dosahoval svého maxima ve 46. hodině (11,607 mg/g biomasy). Množství produkované biomasy kmenem *S. pararoseus* je na testovaném typu odpadního substrátu poměrně nízké, až 4x nižší než na směsi tuku a syrovátky, což může částečně zkreslovat produkční vlastnosti tohoto kmene.



Grafy 17-18: Diagramy koncentrace biomasy v porovnání obsahem lipidů v biomase a procentuálním rozložením mastných kyselin do tří kategorií při kultivaci kmene *Sporidiobolus pararoseus* na odpadním tuku a kávovém hydrolyzátu.

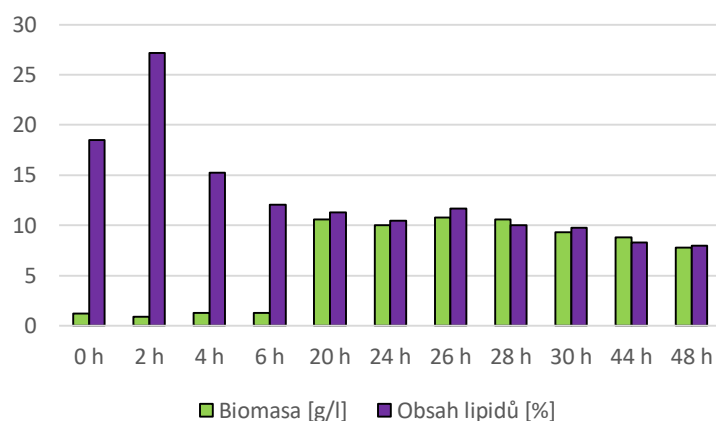
Dle Grafů 17-18 docházelo k nejvyšší kumulaci lipidů v biomase do 24. hodiny kultivace, kdy byla zjištěna nejvyšší hodnota procentuálního zastoupení lipidů v buňkách (21,39 %). Do 44. hodiny buňky snižovaly obsah mastných kyselin v sušině. Ke konci kultivace (46 a 48 h) došlo opět k mírnému vzrůstu nakumulovaných mastných kyselin. Z poměrového zastoupení mastných kyselin byl vypočítán zvyšující se trend obsahu UFA na úkor SFA.

5.1.2.2 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula kratochvilae*

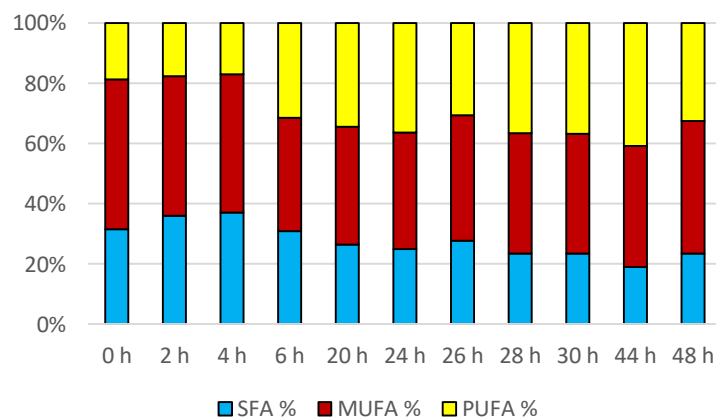


Graf 19: Diagram závislosti průběžných produkčních vlastností biomasy na čase kmene u *Rhodotorula kratochvilae*, kultivovaného ve fermentoru na směsi odpadního živočišného tuku a kávového hydrolyzátu za C/N poměru 13.

Na základě dat, vykreslených v digramu (viz Graf 19), vykazovala kultura po aklimatizaci na produkční médium výrazný nárůst do 20. hodiny kultivace. Svého maxima dosáhla koncentrace biomasy ve 26. hodině (10,8 g/l), kdy byla pravděpodobně spotřebována většina uhlíkatého substrátu, což by vysvětlovalo následnou klesající tendenci v koncentraci biomasy až do ukončení kultivace. Nejvyšší hodnoty koncentrací všech metabolitů v biomase po aklimatizaci kultury v produkčním médiu byly pozorovány ve 24. hodině kultivace. Hodnoty koncentrací byly: pro karotenoidy 5,483 mg/g biomasy, pro ergosterol 11,060 mg/g biomasy a pro koenzym Q 6,375 mg/g biomasy.



*Graf 20: Diagram koncentrace biomasy v porovnání s procentuálním obsahem lipidů při kultivaci kmene *Rhodotorula kratochvilae* na odpadním tuku a kávovém hydrolyzátu.*

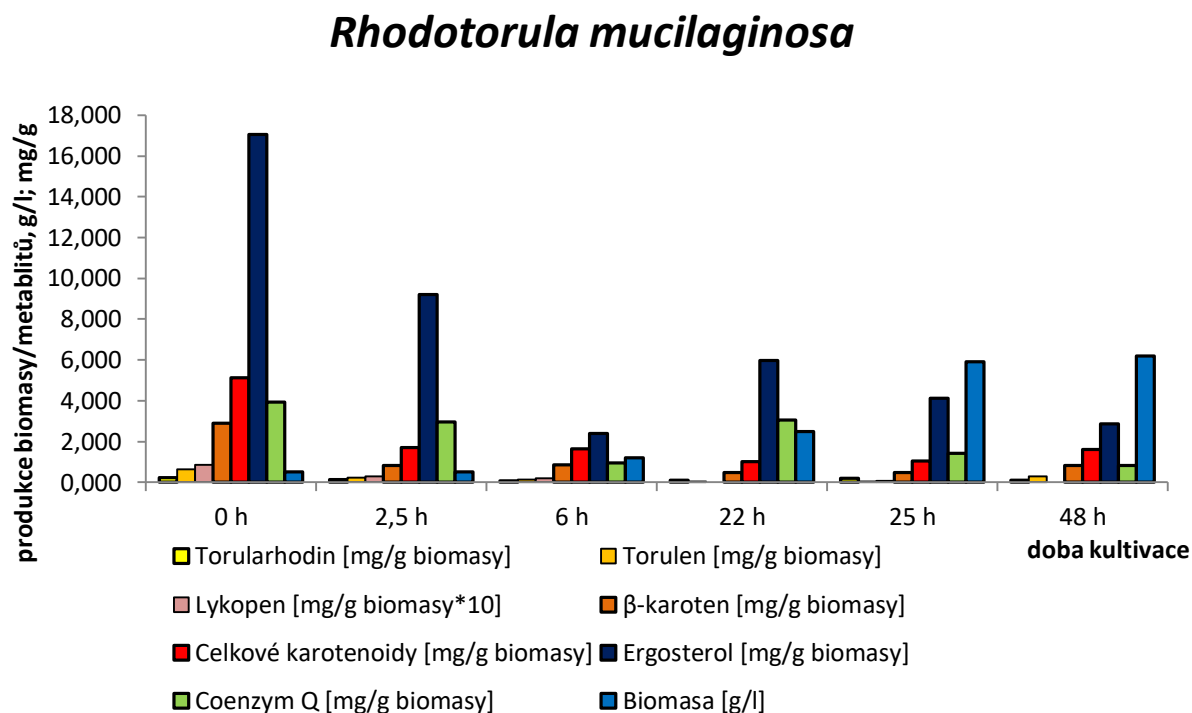


*Graf 21: Diagram procentuálního rozložení mastných kyselin do tří kategorií při kultivaci kmene *Rhodotorula kratochvilae* na odpadním tuku a kávovém hydrolyzátu.*

Z diagramového vyobrazení dat v Grafu 20, bylo vyvozeno, že nejvyšší procentuální zastoupení lipidů v buňkách bylo při 2. hodině kultivace (27,17 %), což si lze vysvětlovat přijímáním volných mastných kyselin buňkami v průběhu lag-fáze.

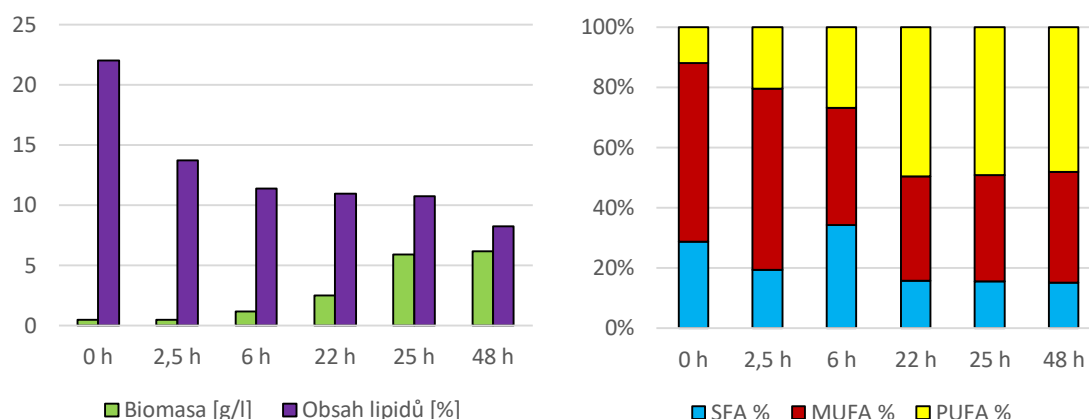
Svého maxima v pozdějších hodinách kultivace dosáhl obsah mastných kyselin v sušině ve 26. hodině kultivace (11,71 %). Procentuální rozložení typů mastných kyselin (viz Graf 21) bylo v průběhu kultivace proměnlivé, přičemž ve všech odběrech byla zjištěna převaha množství UFA nad SFA.

5.1.2.3 Produkční vlastnosti kmene *Rhodotorula mucilaginosa*



Graf 22: Diagram závislosti průběžných produkčních vlastností biomasy na čase kmene u *Rhodotorula mucilaginosa*, kultivovaného ve fermentoru na směsi odpadního živočišného tuku a kávového hydrolyzátu za C/N poměru 13.

Z diagramu (viz Graf 22) je patrné snižování celkových metabolitů v rámci biomasy během lag-fáze (odběry v 0. a 2,5. hodině). Biomasa po překonání lag-fáze vykazovala průběžné přírůstky až do konce kultivace. Maximum sušiny buněk bylo z média získáno ve 48. hodině kultivace (6,2 g/l). Po aklimatizaci biomasy na produkční médium (0-6 h), byla pozorována rostoucí tendence koncentrace karotenoidů v rámci sušiny, maxima bylo dosaženo ve 48. hodině kultivace (1,602 mg/g biomasy). Nejvyšší obsah zbylých sledovaných metabolitů byl vypočítán ve 22. hodině, pro ergosterol 5,983 mg/g sušiny a pro koenzym Q 3,045 mg/g sušiny.

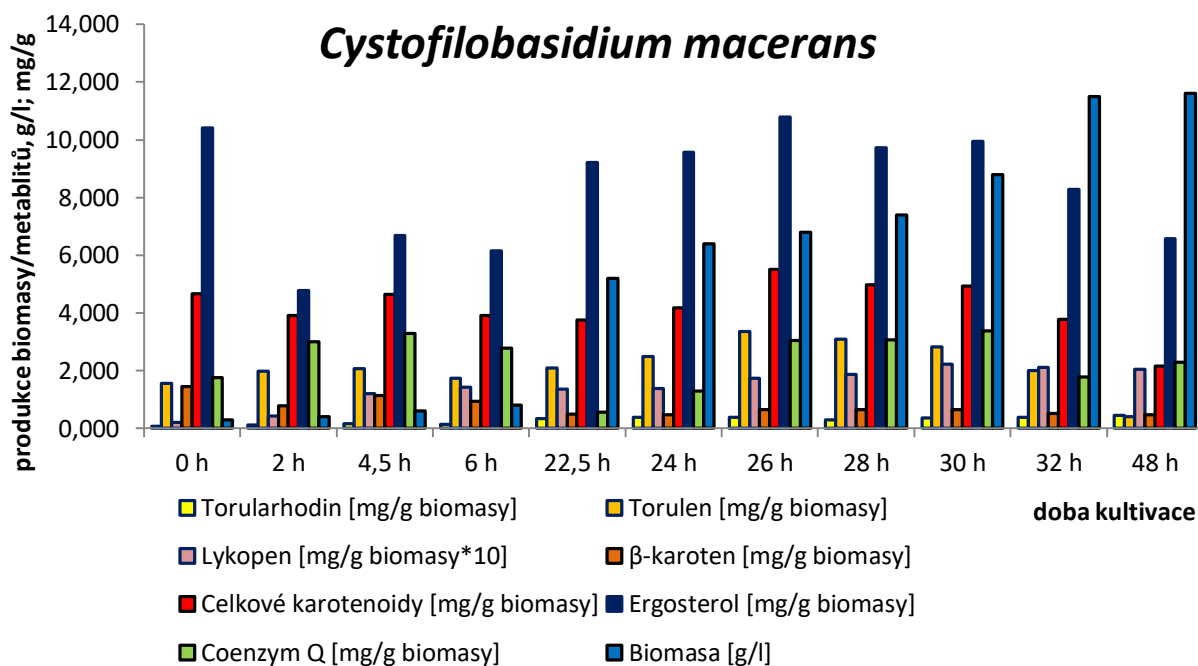


Grafy 23-24: Diagramy koncentrace biomasy v porovnání obsahem lipidů v biomase a procentuálním rozložením mastných kyselin do tří kategorií při kultivaci kmene *Rhodotorula mucilaginosa* na odpadním tuku a kávovém hydrolyzátu.

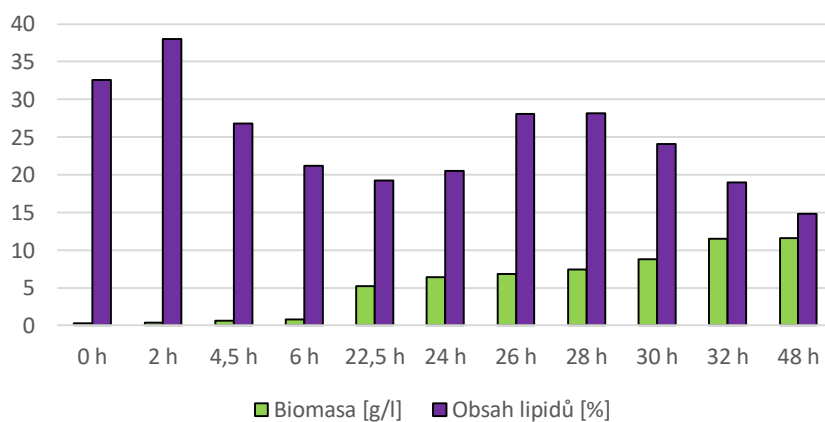
Z diagramů v Grafech 23-24 bylo vypořazováno, že s rostoucím množstvím biomasy v něm klesá procentuální zastoupení lipidů. Nejvyšší procento v biomase obsažených mastných kyselin bylo hned po zočkování média v 0. hodině (22,00 %). Je možné, že v průběhu kultivace kvasinky využívaly zásobní lipidy jako dodatečný zdroj živin. V koncové biomase po 48 hodinách kultivace byl stanoven obsah mastných kyselin na hodnotu 8,25 %. V pozdější odběrech (22-48 h) byl vypořazován stabilní poměr mezi jednotlivými typy mastných kyselin, s nejvyšším poměrovým zastoupením PUFA a nejmenším zastoupením SFA.

5.1.2.4 Produkční vlastnosti kmene *Cystofilobasidium macerans*

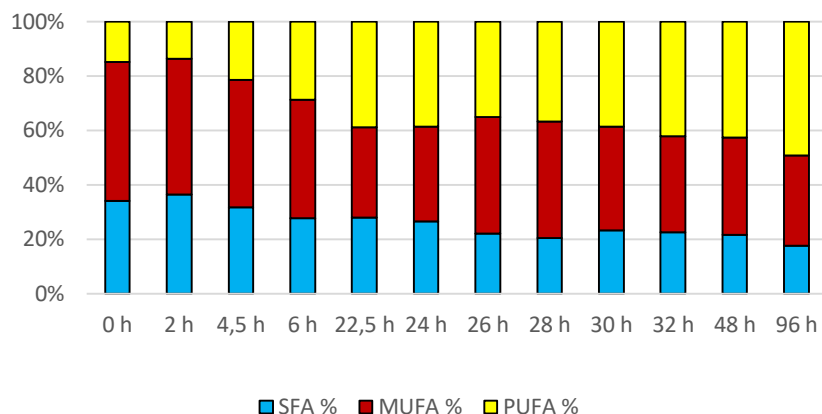
V diagramovém zobrazení v Grafu 25 byla pozorována tendence zvyšující se koncentrace biomasy v průběhu celé kultivace, nejvyšší hodnoty bylo dosaženo ve 48. hodině (11,6 g/l). Množství biomasy bylo u tohoto kmene podobné jako při kultivaci v médiu s odpadním tukem a syrovátkou. Obsah karotenoidů v biomase rostl (22,5-26 h) po aklimatizaci biomasy na produkční medium (0-6 h). Svého maxima dosáhl ve 26. hodině kultivace (5,508 mg/g biomasy) a poté se až do konce kultivace snižoval. Obsah ergosterolu vykazoval obdobné tendence, jako obsah karotenoidů. Maximální zastoupení ergosterolu bylo pozorováno ve 26. hodině (10,783 mg/g). Koncentrace koenzymu Q v biomase vykazovala vzrůstající tendenci mezi hodinami 22,5 až 30, kdy dosáhla své nejvyšší hodnoty (3,375 mg/g biomasy).



Graf 25: Diagram závislosti průběžných produkčních vlastností biomasy na čase kmene u *Cystofilobasidium macerans*, kultivovaného ve fermentoru na směsi odpadního živočišného tuku a kávového hydrolyzátu za C/N poměru 13.



Graf 26: Diagram koncentrace biomasy v porovnání s procentuálním obsahem lipidů při kultivaci kmene *Cystofilobasidium macerans* na odpadním tuku a kávovém hydrolyzátu.

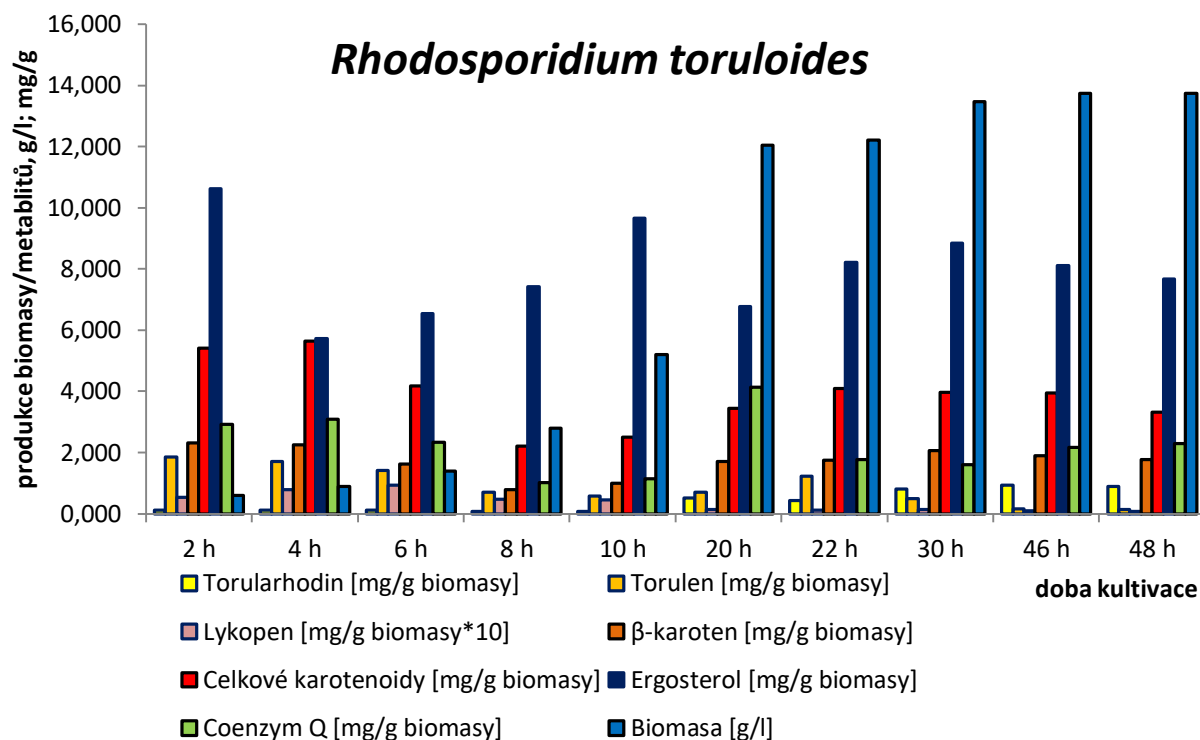


Graf 27: Diagram procentuálního rozložení mastných kyselin do tří kategorií při kultivaci kmene *Cystofilobasidium macerans* na odpadním tuku a kávovém hydrolyzátu.

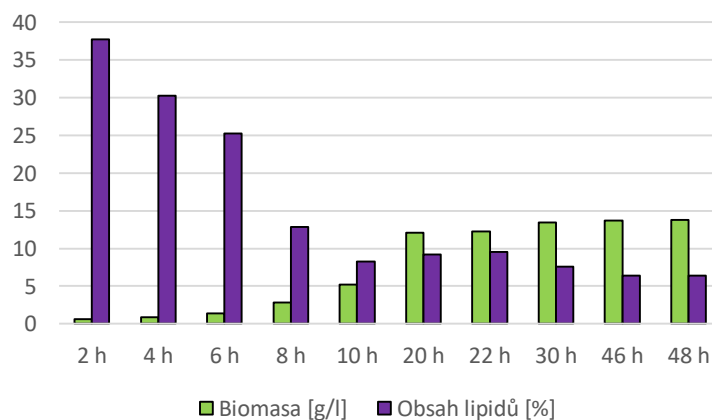
Na základě diagramu v Grafu 26 bylo po aklimatizaci biomasy na médium (0-6 h) pozorováno postupné zvýšení procentuálního zastoupení mastných kyselin v biomase (22,5-28 h). Maxima (při nezapočítání kumulace v průběhu lag-fáze) dosáhlo zastoupení mastných kyselin ve 28. hodině kultivace (28,16 %). Z diagramu vyobrazeného v Grafu 27 je patrné snižování poměrového zastoupení SFA na úkor UFA, za významného přírůstku PUFA, které měly v posledním odběru (48 h) nejvyšší poměrové zastoupení.

5.1.2.5 Produkční vlastnosti kmene *Rhodospiridium toruloides*

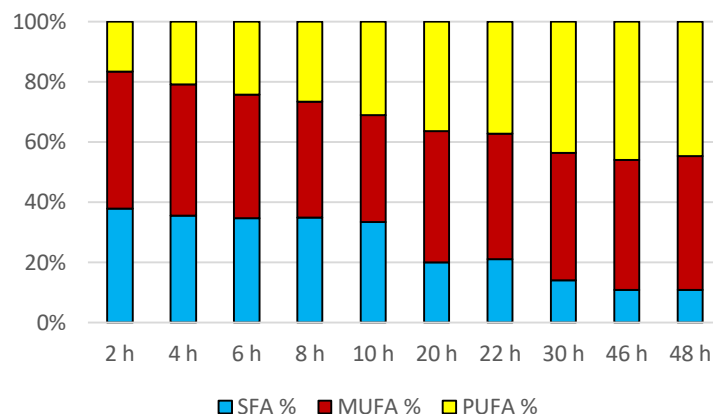
Z Grafu 28 byla vypořovávána narůstající koncentrace biomasy v celém rozsahu kultivační doby. Nejvyšší hodnota byla zjištěna u posledního odběru v čase 48 hodin (13,750 g/l). Tento kmen jako jediný z testovaných produkoval na směsi tuku a kávového hydrolyzátu více biomasy než na médiu s obsahem odpadního tuku a syrovátky. Po přizpůsobení se kvasinek médiu (2-6 h) rostlo množství karotenoidů obsažených v buňkách. Maxima bylo dosaženo ve 22. hodině (4,091 mg/g biomasy). Množství ergosterolu zaznamenalo (mimo počáteční stav v čase 0 h) dvě významná maxima v průběhu kultivace, první bylo zaznamenáno v 10. hodině (9,661 mg/g biomasy) a druhé ve 30. hodině kultivace (8,853 mg/g biomasy). Množství koenzymu Q v sušině se v průběhu času měnilo, nejvyšší hodnoty bylo dosaženo ve 20. hodině kultivace (4,154 mg/g biomasy).



Graf 28: Diagram závislosti průběžných produkčních vlastností biomasy na čase kmene u *Rhodosporidium toruloides*, kultivovaného ve fermentoru na směsi odpadního živočišného tuku a kávového hydrolyzátu za C/N poměru 13.



Graf 29: Diagram koncentrace biomasy v porovnání s procentuálním obsahem lipidů při kultivaci kmene *Rhodosporidium toruloides* na odpadním tuku a kávovém hydrolyzátu.



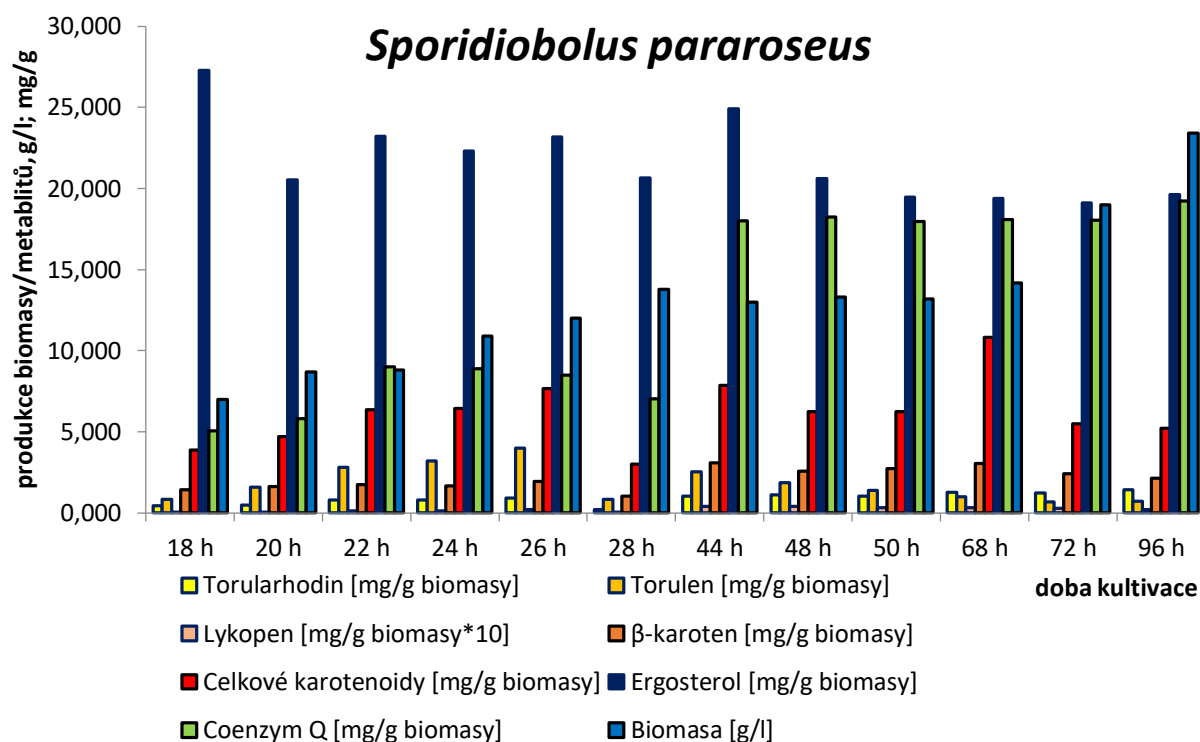
*Graf 30: Diagram procentuálního rozložení mastných kyselin do tří kategorií při kultivaci kmene *Rhodosporidium toruloides* na odpadním tuku a kávovém hydrolyzátu*

Na počátku kultivace docházelo k vysoké kumulaci mastných kyselin z média. Obsah lipidů se postupně snižoval do 10. hodiny kultivace, což opět svědčí pro případné využívání zásobních tuků k růstu. Zvýšení procentuálního množství mastných kyselin v biomase bylo zaznamenáno mezi 10. a 22. hodinou, kde dosáhlo maxima (9,52 %), následovaným postupným snižováním hodnot až do konce kultivace (48 h), (viz Graf 29). Z Grafu 30 byl v průběhu kultivace pozorován, trend rostoucího poměrového zastoupení UFA, hlavně PUFA na úkor poměrového množství SFA.

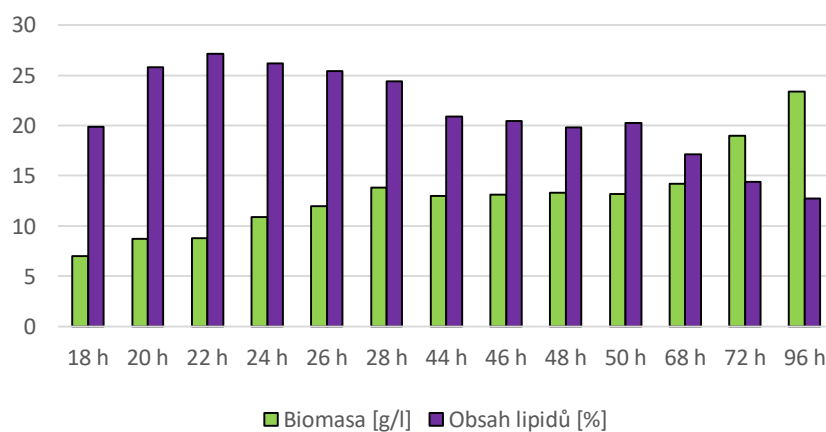
5.1.3 Fermentorová kultivace na směsi kávového oleje a kávového hydrolyzátu

Olej získaný v průběhu extrakce kávové sedliny byl použit ke kultivaci kvasinek při C/N poměru 25, přičemž zastoupení uhlíkatých substrátů ve směsi bylo 3:1 (kávový olej: kávový hydrolyzát). Pro testovací kultivaci byl vybrán kvasinkový kmen *Sporodiobolus pararoseus*, přičemž kultivace probíhala 96 hodin.

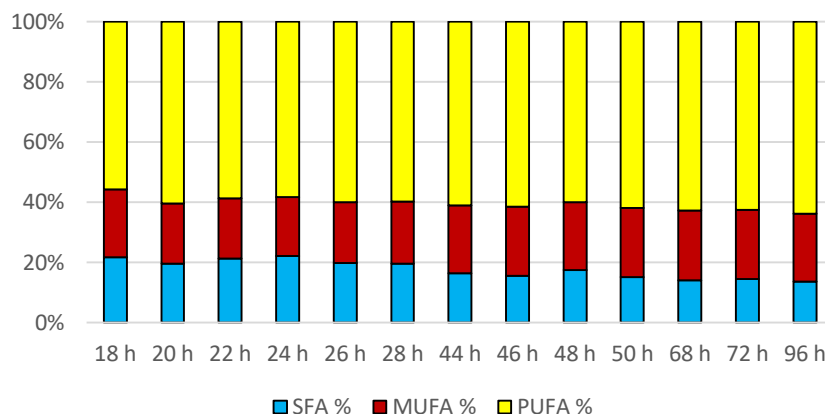
Z Grafu 31 bylo zjištěno, že kvasinková kultura vykazovala intenzivní nárůst do 28. hodiny kultivace, kdy dosáhla lokálního maxima (13,8 g/l). Koncentrace biomasy se ustálila (44-50 h) a nevykazovala výraznější nárůst. Znatelný nárůst byl pozorován až mezi 68. a 96. hodinou, kdy dosáhla produkce biomasy svého maxima (23,4 g/l). Dvoufázový průběh růstu svědčí o využívání endogenních zásobních látek ve stacionární fázi růstu. V průběhu kultivace produkce karotenoidů v buňkách kolísala. Své maximální buněčné koncentrace dosáhla v 68. hodině (10,815mg/g biomasy). Koncentrace ergosterolu se v biomase v průběhu kultivace snižovala. Nejvyšší buněčné koncentrace dosáhla biomasa v 18. hodině kultivace (27,276 mg/g biomasy). Koncentrace koenzymu Q v biomase se v průběhu kultivace zvyšovala, její nejvyšší hodnota byla zaznamenána na v čase 96 hodin (19,240 mg/g biomasy). Vysoké hodnoty produkce ergosterolu a koenzymu Q byly pravděpodobně způsobeny vysokým obsahem lipidů v kultivačním médiu [44].



Graf 31: Diagram závislosti průběžných produkčních vlastností biomasy na čase kmene u *Sporidiobolus pararoseus*, kultivaného ve fermentoru na směsi kávového oleje a kávového hydrolyzátu za C/N poměru 25.



Graf 32: Diagram koncentrace biomasy v porovnání s procentuálním obsahem lipidů při kultivaci kmene *Sporidiobolu pararoseus* na kávovém oleji a kávovém hydrolyzátu.



Graf 33: Diagram procentuálního rozložení mastných kyselin do tří kategorií při kultivaci kmene *Sporidiobolu pararoseus* na kávovém oleji a kávovém hydrolyzátu.

V průběhu kultivace obsah lipidů v buněčné hmotě po dosažení maxima ve 22. hodině postupně klesal až ke svému minimu (96 h), viz Graf 32. Maximální hodnota obsahu lipidů v biomase byla 27,16 %. Pokles obsahu lipidů je zjevně spojen s přírůstkem biomasy ve stacionární fázi, což potvrzuje využívání endogenních substrátů v pozdějších fázích kultivace a přechod kultury na stresový metabolismus. Poměrové zastoupení mastných kyselin se v průběhu kultivace mírně měnilo, byl pozorován úbytek poměrového zastoupení SFA a zvýšení poměrového zastoupení UFA, konkrétně PUFA. Poměrové zastoupení typů mastných kyselin ukazuje Graf 33.

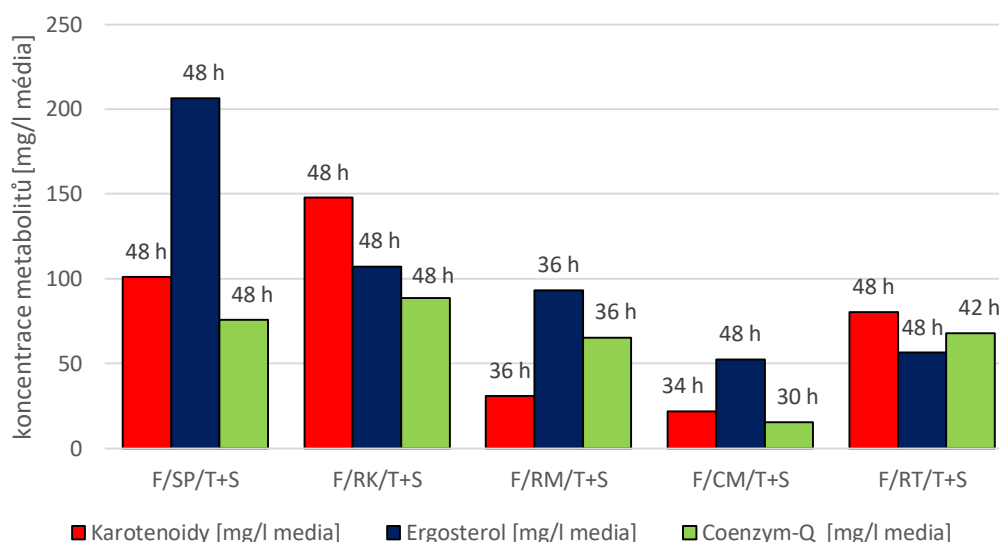
5.1.4 Souhrnné srovnání produkčních charakteristik

Z koncentrace biomasy a obsahu metabolitů v biomase byla vypočítána koncentrace metabolitů v objemu média, což je typická charakteristika pro provozní kultivace. Koncentrace jednotlivých metabolitů byly porovnány v rámci odběrů v jednotlivých fermentorech a nejlepší odběry byly vyneseny do diagramu k porovnání produkčních vlastností kmenů v rámci kultivací na jednotlivých směsích odpadních substrátů.

5.1.4.1 Srovnání výsledků nejlepších odběrů v čase při kultivacích na směsi odpadního tuku a syrovátkového hydrolyzátu

Na základě dat vyobrazených v Grafu 34 bylo zjištěno, že nejvyšší výtěžky karotenoidů a koenzymu Q byly ve fermentoru s kulturou *Rhodotorula kratochvilae*, kultivovanou při C/N poměru 50 při odběru ve 48. hodině kultivace. Koncentrace karotenoidů dosahovala hodnoty 147,754 mg/l média a koncentrace koenzymu Q hodnoty 88,645 mg/l média.

Nejvhodnější pro produkci ergosterolu byla kultura *Sporidiobolus pararoseus* kultivovaná při C/N poměru 50 po dobu 48 hodin. Výsledná koncentrace ergosterolu na litr média nabývala hodnoty 206,455 mg/l.



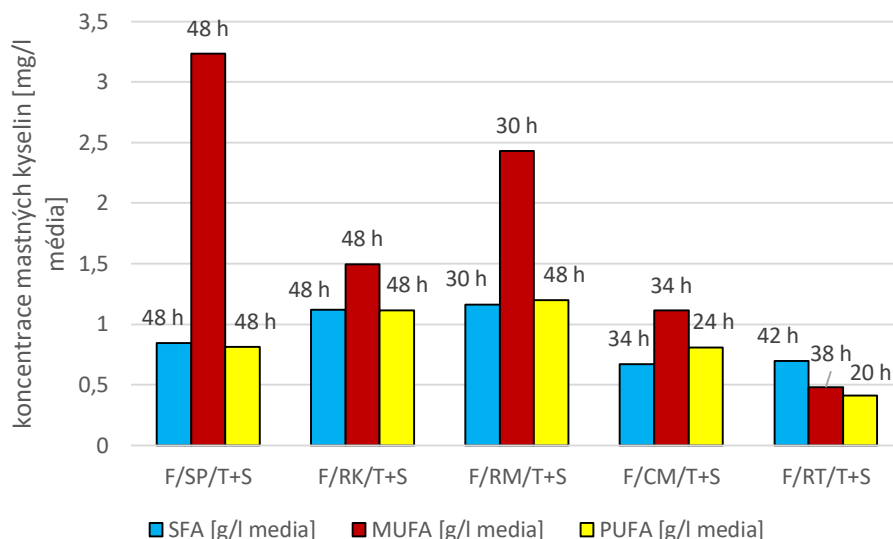
Graf 34: Diagramové srovnání odběrů s nejvyššími koncentracemi metabolitů vztažených na litr média, v konkrétních časech, v jednotlivých fermentorových kultivacích probíhajících na odpadním živočišném tuku a syrovátkovém hydrolyzátu (popisky dat viz Tabulka 13).

Tabulka 13: Legenda k popiskům vzorků pro Grafy 34 a 35.

zkratka	kmen	C/N poměr	složení média
F/SP/T+S	<i>S. pararoseus</i>	50	Tuk + syrovátkový hydrolyzát
F/RK/T+S	<i>R. kratochvilae</i>	50	
F/RM/T+S	<i>R. mucilaginosa</i>	25	
F/CM/T+S	<i>C. macerans</i>	13	
F/RT/T+S	<i>R. toruloides</i>	25	

Nejvyšší koncentrace SFA a PUFA, v rámci kultivací na produkčních médiích obsahujících syrovátkový hydrolyzát a tuk, byly pozorovány při kultivaci kmene *Rhodotorula mucilaginosa* při C/N poměru 25. Koncentrace SFA nabývala nejvyšší hodnoty ve 30. hodině kultivace, a to 1,163 g/l média. Nejvyšší koncentrace PUFA byla získána ve 48. hodině s hodnotou 1,196 g/l média.

Jako nejlepší pro akumulaci MUFA byl vybrán kmen *Sporidiobolus pararoseus* při kultivaci na C/N poměru 50. Nejvyšší koncentrace byla získána při odběru ve 48. hodině s hodnotou 3,231 g/l média. Vizuální srovnání jednotlivých odběrů je uvedeno v Grafu 35.



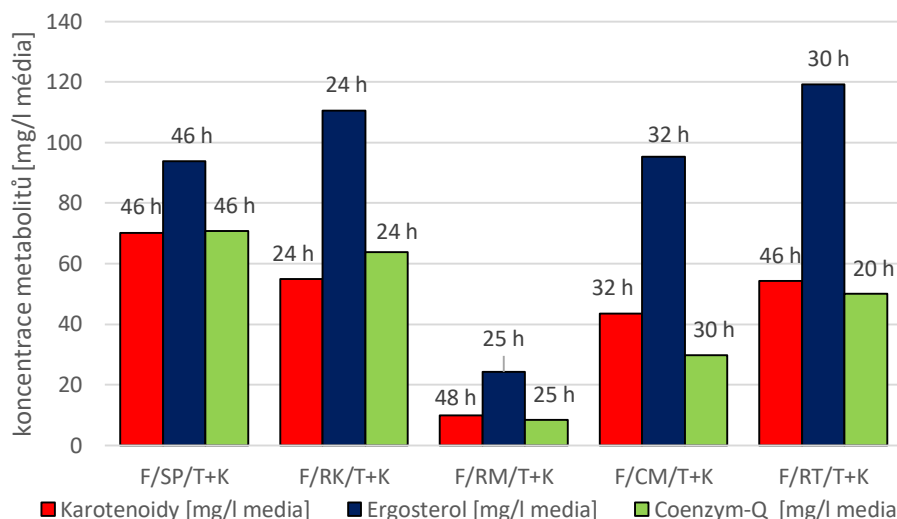
Graf 35: Diagramové srovnání odběrů s nejvyšší koncentrací mastných kyselin na liter média, v konkrétních časech, v jednotlivých fermentorových kultivacích probíhajících na odpadním živočišném tuku a syrovátkovém hydrolyzátu (popisky dat viz Tabulka 13).

5.1.4.2 Souhrn výsledků nejlepších odběrů v čase při kultivacích na směsi odpadního tuku a kávového hydrolyzátu

Z porovnání odběrů vyobrazených v Grafu 36 bylo zjištěno, že nejlepší produkci karotenoidů vykazoval kmen *Sporidiobolus pararoseus* ve 46. hodině kultivace při C/N poměru 13 (70,229 mg/l média).

Pro vysokou produkci ergosterolu na daném typu média, byl nalezen jako nejvhodnější kmen *Rhodosporidium toruloides*, v odběrovém čase 30 hodin a C/N poměru 13. Koncentrace ergosterolu v médiu dosahovala při odběru 119,191 mg/l média.

Nejvyšší koncentrace ergosterolu na daném typu produkčního média byla dosažena při kultivaci kmene *Sporidiobolus pararoseus* v čase odběru 46 hodin a při C/N poměru 13, a to 70,803 mg/l média.

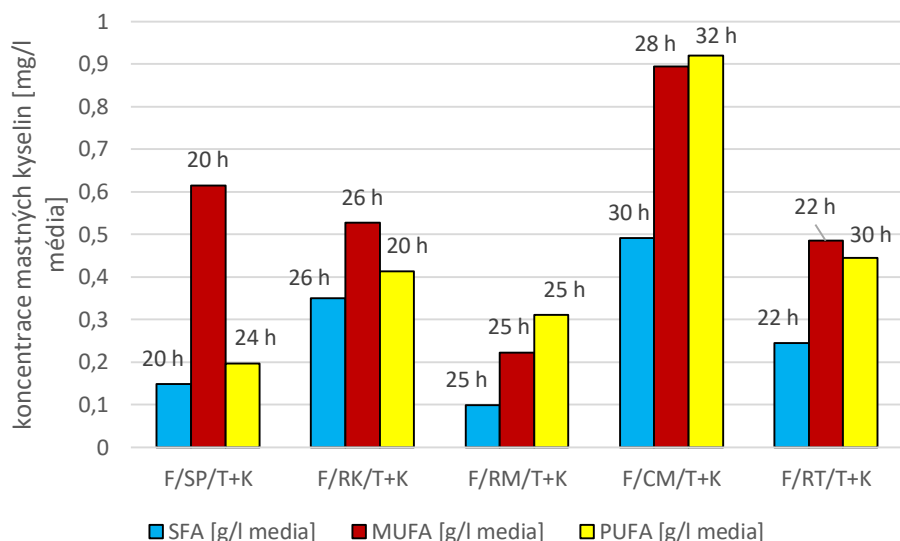


Graf 36: Diagramové srovnání odběrů s nejvyššími koncentracemi metabolitů vztažených na litr média, v konkrétních časech, v jednotlivých fermentorových kultivacích probíhajících na odpadním živočišném tuku a kávovém hydrolyzátu (popisky dat viz Tabulka 14).

Tabulka 14: Legenda k popiskům vzorků pro Grafy 36 a 37.

zkratka	kmen	C/N poměr	složení média
F/SP/T+K	<i>S. pararoseus</i>	13	Tuk + kávový hydrolyzát
F/RK/T+K	<i>R. kratochvilae</i>	13	
F/RM/T+K	<i>R. mucilaginosa</i>	13	
F/CM/T+K	<i>C. macerans</i>	13	
F/RT/T+K	<i>R. toruloides</i>	13	

Nejlepší pro produkci všech typů mastných kyselin byl za daných podmínek (živočišný tuk s kávovým hydrolyzátem jako uhlíkatý substrát a C/N poměr 13) kmen *Cystofilobasidium macerans*. Přičemž nejvyšší koncentrace SFA s hodnotou 0,492 g/ l média byla získána ve 30. hodině kultivace. MUFA dosahovaly nejvyšší koncentrace v 28 hodině (0,895 g/l média). Hodnota koncentrace PUFA byla 0,920 g/l média, při odběru ve 32. hodině. Srovnání viz Graf 37.



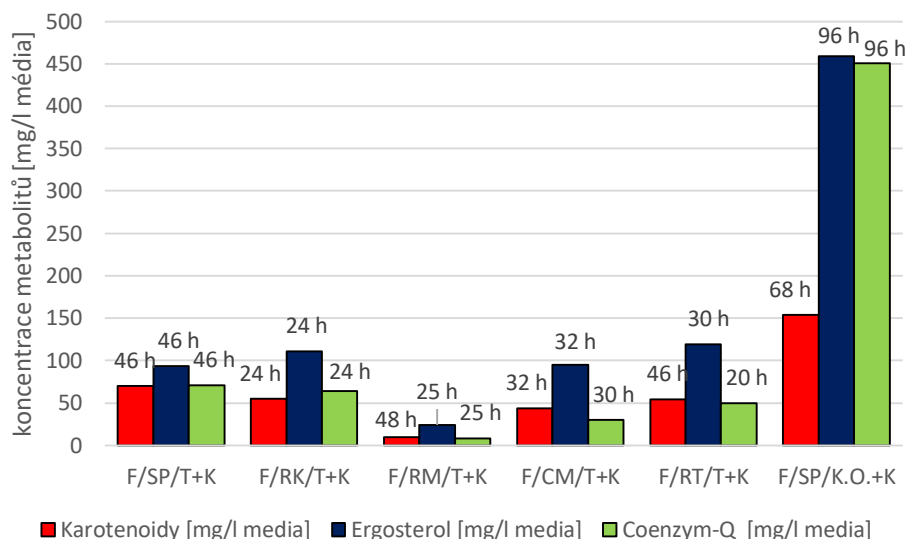
Graf 37: Diagramové srovnání odběrů s nejvyšší koncentrací mastných kyselin na liter média, v konkrétních časech, v jednotlivých fermentorových kultivacích probíhajících na odpadním živočišném tuku a kávovém hydrolyzátu (popisky dat viz Tabulka 14).

5.1.4.3 Srovnání výsledků kultivace na směsi kávového oleje a kávového hydrolyzátu s ostatními fermentorovými kultivacemi

Z diagramu v Grafu 38 bylo vyvozeno, že kmen *Sporidiobolus pararoseus* vykazoval mnohem lepší produkční vlastnosti při kultivaci na směsi kávového oleje a kávového hydrolyzátu, než jakýkoliv kmen kultivovaný na médiu se směsí odpadního tuku a kávového hydrolyzátu. Ve srovnání s kultivací na tuku se syrovátkou, kdy bylo dosaženo za 48 hodin cca 105 mg/l karotenoidů, se kultivace na směsi kávového oleje a hydrolyzátu jeví jako v podstatě srovnatelná.

Nejvyšší koncentrace karotenoidů byla zaznamenána v odběru v 68. hodině, nabývala hodnoty 153,572 mg/l média.

Nejlepších produkčních koncentrací ergosterolu a koenzymu Q v médiu bylo dosaženo v 96. hodině kultivace. Koncentrace nabývaly hodnot, u ergosterolu 458,992 mg/l a u koenzymu Q 450,223 mg/l média.



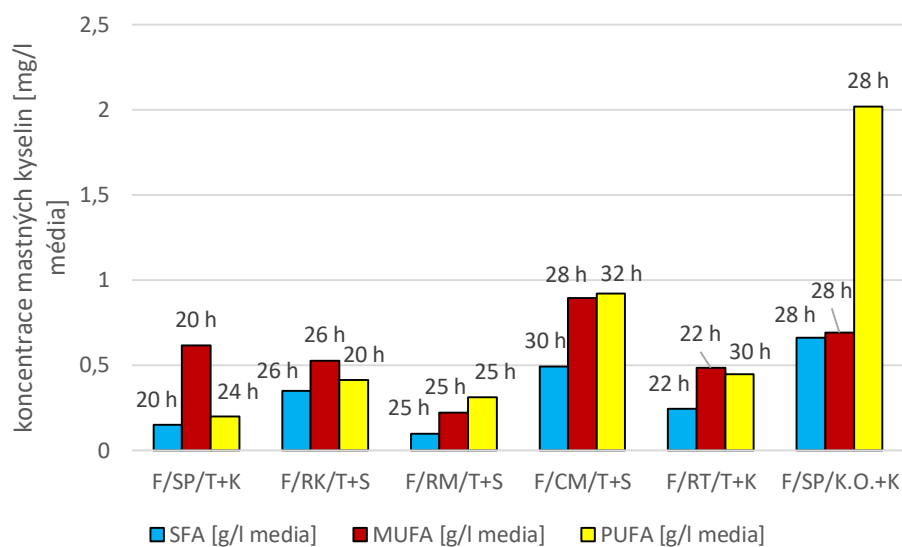
Graf 38: Diagramové srovnání koncentrací daných metabolitů v odběru z fermentoru obsahujícího kávový olej a kávový hydrolyzát se předchozími kultivacemi ve fermentorech obsahujících živočišný odpadní tuk a kávový hydrolyzát (popisky dat viz Tabulka 15).

Tabulka 15: Legenda k popiskům vzorků pro Grafy 38 a 39.

zkratka	kmen	C/N poměr	složení média
F/SP/T+K	<i>S. pararoseus</i>	13	Tuk + kávový hydrolyzát
F/RK/T+K	<i>R. kratochvilae</i>	13	
F/RM/T+K	<i>R. mucilaginosa</i>	13	
F/CM/T+K	<i>C. macerans</i>	13	
F/RT/T+K	<i>R. toruloides</i>	13	
F/SP/K.O.+K	<i>S. pararoseus</i>	25	Kávový olej+ kávový hydrolyzát

Z dat vyobrazených v Grafu 39 bylo zjištěno, že kmen *Sporidiobolus pararoseus* kultivovaný na směsi kávového oleje a kávového hydrolyzátu, za již zmíněných podmínek, vykazoval vyšší akumulaci SFA a PUFA než ostatní kmeny kultivované na směsi tuku s kávovým hydrolyzátem, přičemž koncentrace PUFA v kultivaci na kávovém oleji několika násobně přesahovala koncentrace PUFA v kultivacích na odpadním živočišném tuku.

Optimální čas na odběr byl jak pro SFA, tak pro PUFA v 28. hodině kultivace, kdy hodnoty koncentrací byly, pro SFA 0,661g/l média a pro PUFA 2,017 g/l média. Vysoká akumulace PUFA je pravděpodobně způsobena přítomností oleje v médiu, který je na PUFA bohatý, konkrétně může obsahovat až 43,12 % kyseliny linolové [46].



Graf 39: Diagramové srovnání koncentrací jednotlivých typů mastných kyselin v odběru z fermentoru obsahujícím kávový olej a kávový hydrolyzát se nejlepšími odběry z fermentorů obsahujícími živočišný odpadní tuk a kávový hydrolyzát (popisky dat viz Tabulka 15).

6 Závěr

Práce byla cílena na kultivaci karotenogenních kvasinek v laboratorním bioreaktoru s fokusací na zpracování odpadních produktů potravinářského průmyslu v rámci produkčních médií. Kmeny s vysokými výtěžky žádaných metabolitů by mohly být následně užity jako výchozí produkční systémy pro scale-up do průmyslových měřítek.

Testované kultury kmenů *Rhodotorula mucilaginosa* (CCY 19-4-6), *Rhodotorula kratochvilae* (CCY 20-2-26), *Rhodospiridium toruloides* (CCY 062-002-001), *Sporidiobolus pararoseus* (CCY 19-9-6) a *Cystofilobasidium macerans* (CCY 10-1-2), byly podrobeny fermentorovým kultivacím na dvou typech směsí odpadních materiálů: v médiu byl vždy přítomen odpadní živočišný tuk, k němuž byla v jednom případě přidána hydrolyzovaná odpadní syrovátka a v případě druhém hydrolyzát z kávové sedliny. Doba standardní kultivace ve fermentoru trvala 48 h, přičemž u všech kmenů byla pomocí průběžných odběrů provedena analýza produkčních charakteristik, do nichž spadal přírůstek biomasy a nárůst koncentrací vybraných metabolitů v médiích.

U kmenů kultivovaných na směsi tuku a syrovátky a při vyšších C/N poměrech byly pozorovány velmi dobré výsledky v rámci všech produkčních charakteristik. Při kultivaci na odpadním živočišném tuku a syrovátkovém hydrolyzátu, byly vypořádovány nejvyšší koncentrace biomasy, karotenoidů a koenzymu Q u kmene *Rhodotorula kratochvilae* při odběru ve 48. hodině a při C/N = 50. Dalším kmenem kultivovaným při stejném C/N poměru byl *Sporidiobolus pararoseus*, jenž produkoval na stejném médiu nejvyšší množství ergosterolu v době odběru 48 h. Při analýze produkce lipidů a složení mastných kyselin byly identifikovány kmeny s nejvyšší akumulací, a to *Rhodotorula mucilaginosa* v případě SFA (s dobou odběru 30 h) a PUFA (s dobou odběru 48 h) a *Sporidiobolus pararoseus* v případě MUFA (s odběrem ve 48. hodině).

Kmeny rostoucí v médiích obsahujících odpadní tuk a kávový hydrolyzát byly kultivovány za C/N poměru 13. Díky nižšímu obsahu uhlíkatého zdroje nebylo dosaženo tak velkých produkcí metabolitů a biomasy jako u C/N poměru 50. Nejlepším producentem biomasy a ergosterolu byl kvasinkový kmen *Rhodospiridium toruloides*. Nejvyšší koncentrace biomasy byla dosažena ve 48. hodině a nejvyšší koncentrace ergosterolu ve 30. hodině kultivace. Vysoké koncentrace karotenoidů a koenzymu Q byly dosaženy při kultivaci kmene *Sporidiobolus pararoseus* v odběrovém čase 46 h. Nejvyšší kumulace a produkce všech typů mastných kyselin byla pozorována u kmene *Cystofilobasidium macerans*, přičemž nejvyšší koncentrace SFA byla dosažena ve 30. hodině, u MUFA ve 28. hodině a u PUFA ve 32. hodině kultivace.

Na základě zjištěných vysokých produkcí karotenoidů na směsi s obsahem kávového hydrolyzátu byla provedena srovnávací kultivace kmene *Sporidiobolus pararoseus* na směsi kávového oleje a kávového hydrolyzátu. Kultivace probíhala ve fermentoru při C/N = 25 po dobu 96 hodin. Produkce všech sledovaných metabolitů (vyjma mastných kyselin) několikanásobně převyšovaly výtěžky získané na tukových médiích. Nejvyšší koncentrace karotenoidů byla zjištěna v 68. hodině kultivace. Nejvyšší koncentrace ergosterolu a koenzymu Q byly získány na konci kultivace v 96. hodině. Při kultivaci na kávovém oleji bylo pozorováno, že koncentrace

SFA a PUFA vykazovaly vyšší hodnoty než u kultivací ostatních kmenů na médiu s obsahem tuku. Nejvyšších koncentrací SFA i PUFA bylo dosaženo ve 28. hodině kultivace. Vyšších hodnot produkčních koncentrací metabolitů při kultivaci na kávovém oleji bylo pravděpodobně dosaženo pomocí vyššího C/N poměru a lepší dispergace lipidického substrátu. Živočišný tuk, na rozdíl od oleje, koaguloval do formy větších pelet, jež byly obtížně dispergovatelné v médiu a tudíž i hůře využitelné kvasinkami. Kultivace na kávovém oleji by mohla sloužit i jako model pro kultivace karotenogenních kvasinek na různých typech odpadních olejů.

Závěrem lze shrnout, že karotenogenní kvasinky jsou schopny nejen velmi efektivně využívat odpadní potravinářské materiály i jejich směsi, ale valorizovat je a produkovat průmyslově zajímavé metabolity s vysokou přidanou hodnotou. Převod kultivace do provozního měřítka je prvním krokem k průmyslovému využití těchto kmenů. Předložená práce poskytla v tomto směru velmi cenné výsledky a představuje východisko pro přímý transfer kultivačních procesů do praxe. Práce byla realizována v rámci mezinárodního projektu Lipofungi realizovaného ve spolupráci s Norwegian University of Life Sciences, As, Norsko a s několika norskými průmyslovými subjekty zaměřenými na valorizaci odpadů a podporu cirkulární ekonomiky.

7 Literatura

- [1] VELÍŠEK, Jan. *The Chemistry of food*. 1. Chichester: Wiley, 2014. ISBN 978-1-118-38384-1.
- [2] YAMAGUCHI, Masayoshi. *Carotenoids: properties, effects, and diseases*. New York: Nova Science Publishers, 2010. Biochemistry research trends series. ISBN 978-1-61209-713-8.
- [3] BRITTON, George., S. LIAAEN-JENSEN a H. PFANDER. *Carotenoids handbook: molecular aspects and health issues*. Boston: Birkhäuser Verlag, 2004. ISBN 37-643-6180-8.
- [4] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [5] METZLER, David E. *Biochemistry: the chemical reactions of living cells*. 2nd ed. San Diego: Harcourt Academic Press, 2001-2003. ISBN 01-249-2543-X.
- [6] FRENGOVA, Ginka I. a Dora M. BESHKOVA. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2009, **36**(2), 163-180. DOI: 10.1007/s10295-008-0492-9. ISSN 1367-5435. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-008-0492-9>
- [7] *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, **100**(14), 6103-6117. DOI: 10.1007/s00253-016-7611-8. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7611-8>
- [8] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H. Jinočany: H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [9] ŠÍCHO, Vladislav, Zdeněk VODRÁŽKA a Blanka KRÁLOVÁ. *Potravinářská biochemie*. 2. dopl. a přeprac. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1981, 360 s. : il. ; 8°.
- [10] VOET, Donald, Judith G VOETOVÁ a Judit G VOETOVÁ. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 1325 s. ISBN 80-85605-44-9.
- [11] DOHNAL, Vlastimil, Alena JEŽKOVÁ a Jiří SKLÁDANKA. ERGOSTEROL: KLÍČOVÝ STEROID HUB. *Časopis pro ošetřovatelství a sociální vědy ve zdraví a nemoci*. 2008, **2008**(2), 449-454. ISSN 1212-4117.
- [12] VOIGT, J. *Physiology and Biochemistry of Sterols*. Ed. by G. W. Patterson and W. D. Nes. 395 pages, numerous tables. American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, 1991. Price: 80,— \$ (for members 60,— \$. *Food / Nahrung* [online]. Weinheim:

WILEY-VCH Verlag GmbH, 1992, **36**(4), 424-424 [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.1002/food.19920360437. ISSN 0027-769X.

- [13] KAEAMUKAI, Makoto. Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002, (6), 511-517. ISSN 1389-1723.
- [14] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. 1. Bratislava: Alfa, 1982. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa).
- [15] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna, Dagmar VRANÁ, ed. *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. 1. vyd. Praha: Academia, 1986.
- [16] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 8020010246.
- [17] RIBÂÉREAU-GAYON, Pascal. *Handbook of enology*. 2nd ed. Chichester: Wiley, 2006. ISBN 978-0-470-01034-1.
- [18] MAROVA, Ivana, Milan CERTIK a Emilia BREIEROV. Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts - Application of Whole-Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds. *Biomass - Detection, Production and Usage*. InTech, 2011. DOI: 10.5772/19235. ISBN 978-953-307-492-4. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/biomass-detection-production-and-usage/production-of-enriched-biomass-by-carotenogenic-yeasts-application-of-whole-cell-yeast-biomass-to-pr>
- [19] YURKOV, A. M., M. M. VUSTIN, B. V. TYAGLOV, I. A. MAKSIMOVA a S. P. SINEOKIY. Pigmented basidiomycetous yeasts are a promising source of carotenoids and ubiquinone Q10. *Microbiology*. 2008, **77**(1), 1-6. DOI: 10.1134/S0026261708010013. ISSN 0026-2617. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1134/S0026261708010013>
- [20] KURTZMAN, Cletus a J.W. FELL. *The Yeasts - A Taxonomic Study*. 4. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1998, 1076 s. ISBN 0-444-81312-8.
- [21] FRANCIS, MM, V WEBB a GC ZUCCARELLO. Marine yeast biodiversity on seaweeds in New Zealand waters. *New Zealand Journal of Botany*. 2016, **54**(1), 30-47. DOI: 10.1080/0028825X.2015.1103274. ISSN 0028-825X. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/0028825X.2015.1103274>
- [22] HERNÁNDEZ-ALMANZA, Ayerim, Julio CESAR MONTANEZ, Miguel A. AGUILAR-GONZÁLEZ, Cristian MARTÍNEZ-ÁVILA, Raúl RODRÍGUEZ-HERRERA a Cristóbal N. AGUILAR. Rhodotorula glutinis as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*. 2014, **5**, 64-72. DOI: 10.1016/j.fbio.2013.11.007. ISSN 22124292. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429213000849>

- [23] KOT, Anna M., Stanisław BłAŻEJAK, Agnieszka KURCZ, Iwona GIENTKA a Marek KIELISZEK. Rhodotorula glutinis—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, **100**(14), 6103-6117. DOI: 10.1007/s00253-016-7611-8. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7611-8>
- [24] Rhodotorula rubra DBM 19. In: *Http://old.vscht.cz* [online]. Praha: VŠCHT, 2002 [cit. 2020-05-21]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/kvasinky/kolonie/rhod-rubk.jpg>
- [25] ZHANG, Shuyan, Masakazu ITO, Jeffrey M. SKERKER, Adam P. ARKIN a Christopher V. RAO. Metabolic engineering of the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides IFO0880 for lipid overproduction during high-density fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, **100**(21), 9393-9405. DOI: 10.1007/s00253-016-7815-y. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7815-y>
- [26] FELL, Jack W. a Adele Statzell TALLMAN. Heterothallism in the basidiomycetous yeast genus Sporidiobolus Nyland. *Current Microbiology*. 1981, **5**(2), 77-82. DOI: 10.1007/BF01567423. ISSN 0343-8651. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01567423>
- [27] Sporidiobolus salmonicolor DBM 2161. In: *Http://old.vscht.cz* [online]. Praha: VŠCHT, 2002 [cit. 2020-05-22]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/kvasinky/kolonie/sporidik.jpg>
- [28] OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Dan KUCERA, Sinisa PETRIK a Ivana MAROVA. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *New Biotechnology*. 2015, **32**(6), 569-574. DOI: 10.1016/j.nbt.2015.02.008. ISSN 18716784. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678415000333>
- [29] MUSSATTO, Solange I., Livia M. CARNEIRO, João P.A. SILVA, Inês C. ROBERTO a José A. TEIXEIRA. A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*. 2011, **83**(2), 368-374. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.07.063. ISSN 01448617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710006119>
- [30] AL-HAMAMRE, Zayed, Sascha FOERSTER, Franziska HARTMANN, Michael KRÖGER a Martin KALTSCHMITT. Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. *Fuel*. 2012, **96**, 70-76. DOI: 10.1016/j.fuel.2012.01.023. ISSN 00162361. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016236112000464>

- [31] ZUORRO, Antonio a Roberto LAVECCHIA. Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production*. 2012, **34**, 49-56. DOI: 10.1016/j.jclepro.2011.12.003. ISSN 09596526. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652611005117>
- [32] CAMPOS-VEGA, Rocio, Guadalupe LOARCA-PIÑA, Haydé A. VERGARA-CASTAÑEDA a B. Dave OOMAH. Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*. 2015, **45**(1), 24-36. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.04.012. ISSN 09242244. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415001193>
- [33] ROGINSKI, Hubert, Patrick F. FOX a John W. FUQUAY. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2. Amsterdam: Academic Press, 2003. ISBN 01-222-7239-0.
- [34] FRENGOVA, Ginka, Emilina SIMOVA a Dora BESHKOVA. Use of Whey Ultrafiltrate as a Substrate for Production of Carotenoids by the Yeast *Rhodotorula Rubra*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2004, **112**(3), 133-142. DOI: 10.1385/ABAB:112:3:133. ISSN 0273-2289. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1385/ABAB:112:3:133>
- [35] ONWULATA, Charles I. a Peter J. HUTH. *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. 1. Singapore: Fabulos Printers, 2008. ISBN 978-0-8138-0903-8.
- [36] O'BRIEN, Richard D. *Fats and Oils Formulating and Processing for Applications*. 3. USA: Taylor & Francis Group, LLC, 2009. ISBN 978-1-4200-6166-6.
- [37] PROŠKOVÁ, Alexandra, Jiří KUČERA a Zdenka KOPICOVÁ. POROVNÁNÍ KYSELE A BAZICKY KATALYZOVANÉ TRANSESTERIFIKACE KAFILERNÍHO TUKU METHANOLEM. *Chemické listy*. 2009, **103**(12), 1034-1036.
- [38] KAŠTÁNEK, František. *Bioinženýrství*. 1. Praha: Academia, 2001. ISBN 80-200-0768-7.
- [39] PÁCA, Jan. Bioreaktory. *Kvasný průmysl*. 1987, **33**(1), 20-21.
- [40] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie II*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [41] SETTLE, Frank A. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. 1. New Jersey: Prentice Hall PTR, 1997. ISBN 0-13-177338-0.
- [42] PATNAIK, Pradyot. *Dean's analytical chemistry handbook*. 2. McGraw Hill Professional, 2004. ISBN 0071410600, 9780071410601.
- [43] ARMAREGO, W. L. F. a Christina CHAI LI LIN. *Purification of laboratory chemicals* [online]. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2003 [cit. 2017-12-04]. ISBN

9780750675710.

Dostupné

z:

<https://ebookcentral.proquest.com/lib/vutbrno/reader.action?docID=349670>

- [44] SZOTKOWSKI, Martin, Dana BYRTUSOVA, Andrea HARONIKOVA, Marie VYSOKA, Marek RAPTA, Volha SHAPAVAL a Ivana MAROVA. Study of Metabolic Adaptation of Red Yeasts to Waste Animal Fat Substrate. *Microorganisms*. 2019, **7**(11), 578-604. DOI: 10.3390/microorganisms7110578. ISSN 2076-2607. Dostupné také z: <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/11/578>
- [45] *Valorizace odpadního živočišného tuku pomocí karotenogenních kvasinek* [online]. Brno, 2019 [cit. 2020-05-29]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115838>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.
- [46] SOMNUK, Krit, Pichai EAWLEX a Gumpon PRATEEPCHAIKUL. Optimization of coffee oil extraction from spent coffee grounds using four solvents and prototype-scale extraction using circulation process. *Agriculture and Natural Resources*. 2017, **51**(3), 181-189. DOI: 10.1016/j.anres.2017.01.003. ISSN 2452316X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452316X17303393>

8 Seznam použitých zkratk

ACP	Acyl Carrier Protein
CM	<i>Cystofilobasidium macerans</i>
C/N	poměr uhlíku k dusíku
CoA	koenzym A
F	fermentor
FID	plamenově ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
K.O.+K	směs kávového oleje a kávového hydrolyzátu
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
PDA	detektor diodového pole
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
RK	<i>Rhodotorula kratochvilae</i>
RM	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
RT	<i>Rhodospiridium torulaides</i>
SFA	nasycené mastné kyseliny
SP	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>
SRN	Spolková republika Německo
T+K	směs tuku a kávového hydrolyzátu
T+S	směs tuku a syrovátkového hydrolyzátu
UFA	nenasycené mastné kyseliny
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření